

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

Síndrome de Kindler: estudio clínico, bioquímico y genético.
Modelo preclínico

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Elena Aguirregoicoa García

Directoras

María Teresa Tejerina Sánchez
Marta García Díez

Madrid

© Elena Aguirregoicoa García, 2019

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA



**Síndrome de Kindler: Estudio Clínico, Bioquímico y
Genético. Modelo Preclínico.**

Tesis Doctoral
Elena Aguirregoicoa García

Directores:

Dra. María Teresa Tejerina Sánchez

Dra. Marta García Díez



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS
PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. ELENA AGUIRREGOICOA GARCÍA,
estudiante en el Programa de Doctorado INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA,
de la Facultad de MEDICINA _____ de la Universidad Complutense de
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y
titulada:

SÍNDROME DE KINDLER: ESTUDIO CLÍNICO, BIOQUÍMICO Y GENÉTICO. MODELO PRECLÍNICO

y dirigida por: Dra. TERESA TEJERINA SANCHEZ
Dra MARTA GARCIA DIAZ

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 12 de julio de 2019

Fdo.: _____

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en
la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.

El trabajo de investigación presentado en esta memoria ha sido realizado en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, así como en la Unidad de Medicina Regenerativa del Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT) y Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER U714), dirigido por la Dra. Marcela del Río Nechaevsky.

Quiero expresar mi agradecimiento:

A la **Dra. Marcela del Río Nechaevsky**, por haberme ofrecido la oportunidad de llevar a cabo esta tesis, facilitándome todos los medios disponibles en la Unidad que dirige. Gracias por haber depositado en mí la confianza para hacer este trabajo.

A la **Dra. María Teresa Tejerina Sánchez**, por aceptar ser mi directora y tutora de tesis y por su apoyo a lo largo de estos años para sacar adelante este trabajo. Su atención y empuje han sido determinantes para que finalmente esta tesis llegue a buen puerto.

A la **Dra. Marta García Díez**, no sólo por aceptar ser mi directora de tesis, sino por haber estado a mi lado desde el primer momento, enseñándome, guiándome y siendo mi compañera en un camino que ha durado años, en los que siempre he podido contar con ella.

Al **Dr. Homero Penagos**, dermatólogo de la Caja de Seguro Social, Universidad Autónoma de Chiriquí (Panamá), por haber proporcionado el material documental y biológico de los pacientes panameños incluidos en este estudio. Gracias por tu apoyo y generosidad, fundamental para poder incluir en este trabajo una población de pacientes muy significativa en una enfermedad poco frecuente.

A los compañeros de la **Unidad de Medicina Regenerativa del CIEMAT**, siempre dispuestos a ayudar. Hicisteis de mi paso por el CIEMAT una grata experiencia, por lo que siempre os recordaré con cariño.

Al **Dr. Antonio Rios Parra**, por su contribución a esta tesis revisando las alteraciones de la mucosa oral y periodontal de los pacientes. Gracias Antonio por tu ayuda y compañerismo.

ÍNDICE

1. RESUMEN	5
2. INTRODUCCIÓN	11
2.1. La piel	13
2.1.1. La organización de la piel	13
2.1.2. La unión dermo-epidérmica. Hemidesmosomas y adhesiones focales	15
2.2 La alteración de base genética de las proteínas de la unión dermo-epidérmica: Epidermolisis Bullosa Hereditaria	18
2.2.1. Clasificación	19
2.2.2 Diagnóstico. Generalidades	23
2.3. Kindlinas	27
2.3.1. Generalidades	27
2.3.2. Estructura	28
2.3.3. Isoformas	30
2.3.4. Patrones de expresión y localización	30
2.3.4.1. Kindlina-1	31
2.3.4.2. Kindlina-2	32
2.3.4.3. Kindlina-3	33
2.3.5. Proteínas de unión a kindlina	33
2.3.6. Funciones	34
2.3.7. Enfermedades. Modelos animales y celulares. Cáncer	35
2.3.7.1. Kindlina-1	35
2.3.7.2. Kindlina-2	36
2.3.7.3. Kindlina-3	37
2.3.7.4. Kindlinas y cáncer	37
2.4. Síndrome de Kindler	38
2.4.1. Características generales	38
2.4.2. Características clínicas	39
2.4.3. Diagnóstico	44
2.4.4. Diagnóstico diferencial	51

2.4.5. Tratamiento	52
2.5. Terapia génica	53
2.6. Modelo animal	54
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	57
4. MATERIAL Y MÉTODOS	61
4.1. Pacientes	63
4.2. Muestras	63
4.3. Análisis histológico y de inmunofluorescencia	64
4.4. Procesamiento de las biopsias para el aislamiento y cultivo celular	65
4.5. Estudio genético	68
4.6. Preparación de los equivalentes dermo-epidérmicos humanos	71
4.7. Generación del modelo de ratón humanizado	73
4.7.1. Animales de experimentación	73
4.7.2. Trasplante del equivalente	73
4.7.3. Verificación del modelo	76
5. RESULTADOS	77
5.1. Estudio clínico	79
5.2. Estudio histológico y de inmunofluorescencia	92
5.3. Estudio genético	97
5.4. Modelo humanizado de ratón	100
6. DISCUSIÓN	105
6.1. Nuestra población de estudio y su importancia	107
6.2. Estudio clínico	107
6.3. Correlación genotipo-fenotipo	116
6.3.1. Pacientes 1, 2, 3 y 4	117
6.3.2. Paciente 5	117
6.3.3. Paciente 6	119
6.3.4. Paciente 7	120
6.3.5. Pacientes 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15	123
6.4. Modelo humanizado de ratón	124

7. CONCLUSIONES.....	127
----------------------	-----

8. BIBLIOGRAFÍA.....	131
----------------------	-----

El Síndrome de Kindler (SK), es una genodermatosis rara, de herencia autosómica recesiva y prevalencia desconocida, que cuenta con 250 casos publicados hasta la fecha (Orphanet report series, 2019).

Descrito por primera vez en 1954 por la Dra. Kindler, hasta el año 2003 no se identificó el gen implicado y paulatinamente se van conociendo los mecanismos moleculares que subyacen en la enfermedad. El SK se debe a distintas mutaciones en el gen Fermitin Family Member 1 (FERMT1), que codifica la proteína kindlina-1. Las características clínicas más frecuentes incluyen la presencia, en general desde el nacimiento, de ampollas en zonas acras, atrofia cutánea desde la infancia, fotosensibilidad, poiquilodermia progresiva y distintos grados de afectación mucocutánea.

En el presente trabajo se valoran las características fenotípicas y genéticas de 15 sujetos, 8 de ellos procedentes de la tribu Panameña Ngöbe-Buglé, que presenta una alta frecuencia de SK. Los datos clínicos y el material biológico de estos pacientes han sido proporcionados por el Dr. Penagos, dermatólogo de la Caja de Seguro Social, Universidad Autónoma de Chiriquí (Panamá). Los 7 pacientes restantes han sido recopilados y/o estudiados en la Unidad de Medicina Regenerativa del CIEMAT desde el año 2005 hasta el presente.

El SK presenta una gran variabilidad clínica, originando desde fenotipos muy leves hasta cuadros con graves complicaciones que comprometen la vida del paciente. Existe un gran interés en la correlación genotipo-fenotipo de la enfermedad, es decir, en el conocimiento de la correspondencia entre mutaciones concretas y características clínicas. En este trabajo se ha realizado una búsqueda exhaustiva del material publicado hasta la fecha sobre las características clínicas y el diagnóstico genético en pacientes de SK, aportando además los hallazgos de nuestro estudio.

Siguiendo los protocolos creados y probados en la Unidad de Medicina Regenerativa del CIEMAT, se ha realizado un modelo de ratón humanizado, mediante el injerto de piel bioingenierizada, a partir de queratinocitos y fibroblastos de 3 de nuestros pacientes. Este modelo, realizado por primera vez para el SK, recapitula las características de la enfermedad y puede ser útil tanto para ampliar el conocimiento de esta patología como para el estudio de nuevas propuestas terapéuticas como la terapia génica.

Kindler's syndrome (KS) is a rare genodermatosis with an autosomal recessive inheritance and an unknown prevalence, with 250 cases published to date (Orphanet report series, 2019).

First described in 1954 by Dr. Kindler, until 2003 the gene involved was not identified and gradually the molecular mechanisms underlying the disease are known. SK is due to different mutations in the Fermitin Family Member 1 gene (FERMT1), which encodes the kindlin-1 protein. The most frequent clinical characteristics include the presence, in general from birth, of blisters in acral areas, cutaneous atrophy since childhood, photosensitivity, progressive poikiloderma and different degrees of mucocutaneous involvement.

In the present thesis, the phenotypic and genetic characteristics of 15 subjects are evaluated, 8 of them coming from the Panamanian Ngobe-Buglé tribe, which presents a high frequency of SK. The clinical data and the biological material of these patients have been provided by Dr. Penagos, dermatologist of the Social Security Fund, Autonomous University of Chiriqui (Panama). The remaining 7 patients have been collected and / or studied in the CIEMAT Regenerative Medicine Unit from 2005 to the present.

The KS presents a great clinical variability, originating from very mild phenotypes to cases with serious complications that compromise the life of the patient. There is great interest in the genotype-phenotype correlation of the disease, that is, in the knowledge of the correspondence between specific mutations and clinical characteristics. In this work an exhaustive search has been made of the material published to date on the clinical characteristics and genetic diagnosis in KS patients, also contributing the findings of our study.

Following the protocols created and tested in the CIEMAT Regenerative Medicine Unit, a humanized mouse model was made, using bioengineered skin grafting, from keratinocytes and fibroblasts from 3 of our patients. This model, made for the first time for SK, recapitulates the characteristics of the disease and can be useful both to expand the knowledge of this pathology and for the study of new therapeutic approaches such as gene therapy.

2.1. La piel

2.1.1. La organización de la piel

La piel es un órgano altamente especializado que sirve de barrera entre el organismo y su entorno, protegiéndolo de factores externos nocivos y manteniendo los sistemas internos intactos, a la vez que funciona como órgano sensorial.

La piel está formada por tres compartimentos bien definidos: la epidermis, la dermis y la hipodermis o tejido celular subcutáneo.

La **epidermis** es un epitelio estratificado y queratinizado, compuesto por capas de queratinocitos dispuestos según su grado de diferenciación. Es simultáneamente una barrera estable que nos protege y una estructura dinámica con gran capacidad regenerativa frente a las agresiones externas.

En la epidermis se reconocen cuatro estratos: basal, espinoso, granular y córneo (figura 1). El estrato basal o germinativo está formado por una capa de queratinocitos con alto potencial proliferativo, anclados a la membrana basal. A medida que las células basales abandonan este estrato y migran hacia la superficie, paran de dividirse y se diferencian, dando lugar a los estratos espinoso y granuloso. Finalmente los queratinocitos se convierten en las células aplanadas enucleadas y queratinizadas, que forman el estrato córneo.

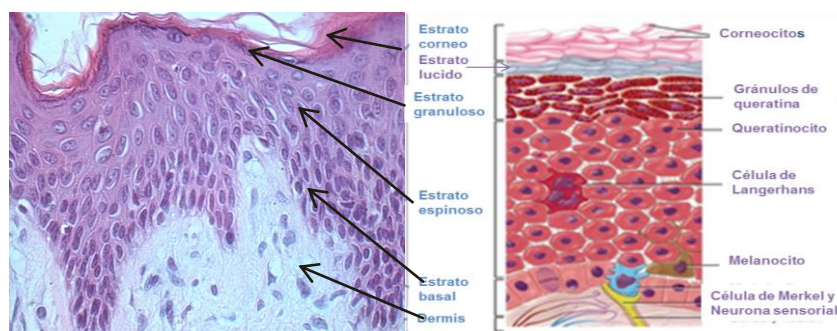


Figura 1. Histología de la piel. En las regiones de piel gruesa (palmas y plantas), a las capas ya mencionadas se añade el estrato lucido. En la epidermis, además de queratinocitos, encontramos melanocitos y células de Langerhans y de Merkel.

INTRODUCCIÓN.

El citoesqueleto de los queratinocitos está formado por filamentos de queratina, actina y tubulina, de cuya coordinación dependen la morfología, la migración celular y el remodelado del tejido (Even-Ram et al, 2007).

Las queratinas son el componente predominante del citoesqueleto de los queratinocitos. Se expresan en pares específicos de cada estrato, autoensamblándose para formar una red tridimensional de filamentos que se extienden desde el núcleo hasta la membrana celular (Moll et al, 1982).

Rodeando la membrana se condensa una gran cantidad de filamentos de actina, que se polimerizan y entrecruzan, formando distintas protusiones de membrana (filopodios, fibras de estrés y lamelipodios), esenciales para el movimiento celular (Vicente-Manzanares et al, 2005).

La **dermis** está conformada por células dispersas en una abundante matriz extracelular. Es un tejido conectivo de soporte compuesto principalmente de fibras de colágeno y elásticas, donde la célula predominante es el fibroblasto y en el que se encuentran inmersos los vasos sanguíneos, terminaciones nerviosas, glándulas y folículos pilosos. En la dermis se distinguen la dermis papilar, más superficial, compuesta por un tejido conjuntivo laxo y la dermis reticular, compuesta por un tejido conjuntivo denso con abundantes fibras elásticas.

El límite entre la epidermis y la dermis se establece por el depósito por parte de los queratinocitos y de los fibroblastos de una capa de matriz extracelular especializada llamada membrana basal. En dicha capa se distinguen la lámina lucida y la lámina densa. La primera está formada fundamentalmente por lamininas y la segunda por colágeno tipo IV. La lámina densa se ancla a la dermis mediante fibras de colágeno tipo VII (figura 2)

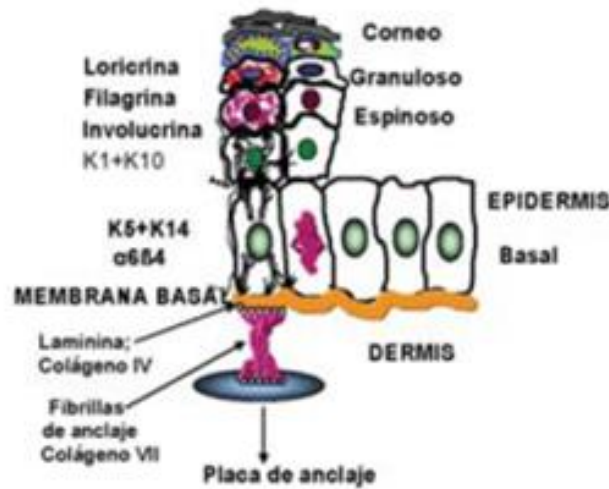


Figura 2. Marcadores epiteliales. Las distintas proteínas, expresadas en función de la diferenciación celular de cada estrato, son usadas como marcadores epiteliales. En la dermis se localizan el colágeno tipo IV y VII. En el estrato basal se expresan las queratinas 5/14 y la integrina transmembrana $\alpha 6 \beta 4$. En el estrato espinoso se localiza el par de queratinas 1/10. La involucrina, precursor de la capa celular cornificada, se sintetiza en capas superiores al estrato espinoso. En el estrato granuloso dejan de sintetizarse queratinas y se inicia la producción de filagrina y loricrina, considerados marcadores de diferenciación terminal.

2.1.2. La unión dermo-epidérmica. Hemidesmosomas y adhesiones focales

Los queratinocitos basales se adhieren al tejido conectivo subyacente por la interacción con las proteínas de la membrana basal (figura 3), siendo esta unión fundamental para el mantenimiento de la integridad y función de los tejidos (Larjava et al, 2008).

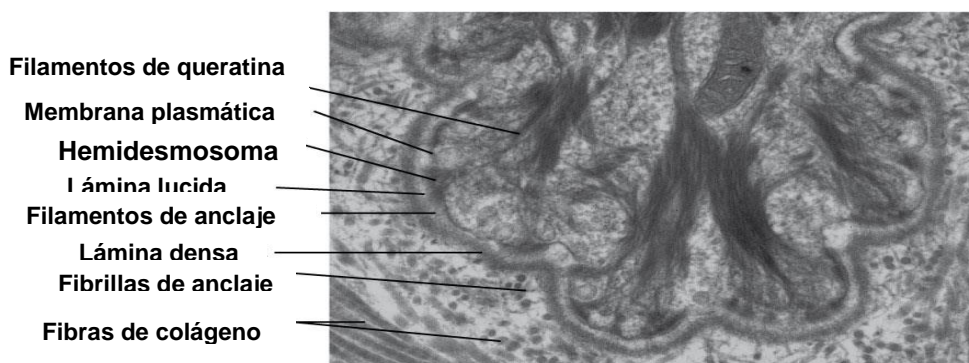


Figura 3. Unión dermoepidérmica en piel humana. Microscopía electrónica. Se trata de una estructura compleja formada por la membrana plasmática de los queratinocitos basales, la membrana basal y la parte superior de la dermis papilar. Imagen tomada de **McMillan et al, 2003**.

En la conservación de la morfología celular y de las propiedades de las células epidérmicas, juegan un papel fundamental el citoesqueleto de los queratinocitos, las uniones intercelulares (desmosomas, uniones oclusivas, uniones adherentes, uniones comunicantes) y la unión dermo-epidérmica (hemidesmosomas y adhesiones focales).

Los queratinocitos basales se anclan a la membrana basal a través de proteínas transmembrana, llamadas **integrinas**, que forman parte de los **hemidesmosomas** y de las **adhesiones focales**. Las integrinas son heterodímeros compuestos por una cadena α y una cadena β unidas de forma no covalente. En las células eucariotas hay 18 subunidades α y 8 β , que se combinan dando lugar a 24 tipos de integrinas, cada una de las cuales parece tener una función y ligandos específicos (Hynes 2002). De todas ellas, al menos 11 se encuentran en los queratinocitos, algunas de forma constante y otras sólo durante la curación de heridas y en condiciones patológicas (Margadant et al, 2010). Todas las integrinas se unen a los microfilamentos de actina, excepto $\alpha 6\beta 4$, que lo hace a los filamentos intermedios de queratina.

En la piel sana, los hemidesmosomas unen los filamentos intermedios de queratina del citoesqueleto con la membrana basal (figura 4) (Tsuruta et al, 2003). Es una unión estable y robusta (Jones et al, 1998).

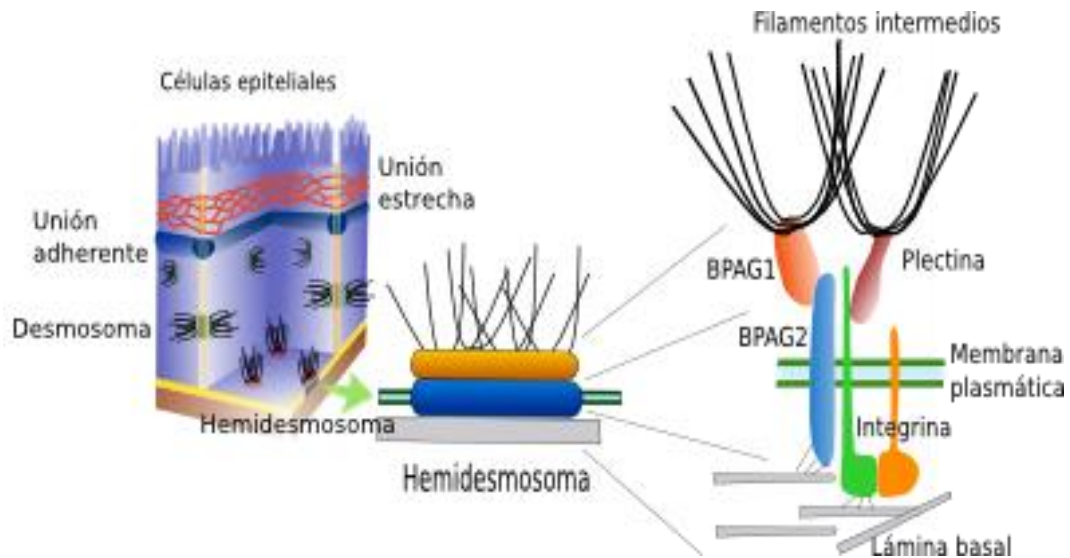


Figura 4. Composición de los hemidesmosomas. Los hemidesmosomas, localizados a lo largo de la membrana basal a modo de placas citoplasmáticas electrodensas, están formados por 2 proteínas transmembrana: BPAG2 (colágeno tipo XVII) e integrina $\alpha 6 \beta 4$. Los dominios extracelulares de ambas proteínas interactúan con la laminina-332 de la membrana basal, mientras los dominios intracelulares lo hacen con el citoesqueleto de queratina, mediante la unión con BPAG1 y plectina (Jones et al, 1998).

Las adhesiones focales unen el citoesqueleto de actina a la membrana basal, a la vez son estructuras dinámicas que pueden “desensamblarse” rápidamente cuando la célula necesita migrar o dividirse (figura 5) (Tsuruta et al, 2011).

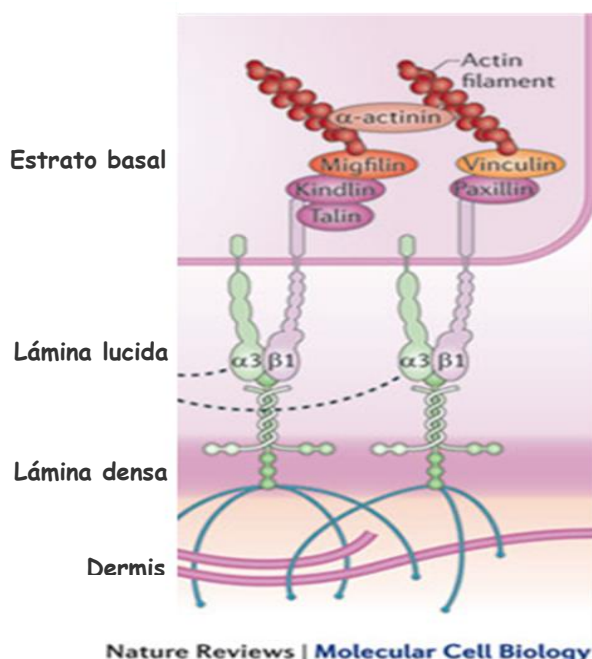


Figura 5. Composición de las adhesiones focales. En las adhesiones focales el dominio intracelular de la integrina se une a los microfilamentos de actina mediante distintas proteína adaptadoras, mientras el dominio extracelular se asocia a diversos ligandos específicos de la matriz extracelular (colágeno tipo IV, laminina-332.) (DiPersio et al, 1995).

2.2. La alteración de base genética de las proteínas de la unión dermo-epidérmica: Epidermolisis Bullosa Hereditaria

El término Epidermolisis Bullosa o Ampollosa Hereditaria (EB) engloba un grupo de genodermatosis, de muy baja prevalencia, ocasionadas por mutaciones en genes que codifican proteínas implicadas en el mantenimiento de la unión dermo-epidérmica. Estas enfermedades se caracterizan por una marcada fragilidad cutánea con formación, espontánea o inducida por trauma mínimo, de ampollas y erosiones en la piel y mucosas (Fine et al, 2008). La clasificación de EB engloba más de 30 subtipos, con más de 1000 mutaciones en al menos 14 genes estructurales (tabla 1).

2.2.1. Clasificación.

Tabla 1. Clasificación de EB. Tabla adaptada de Intong y Murrell, 2012.

Tipo Mayor	Subtipo mayor	Subtipo menor	Proteína afectada
EBS	Suprabasal	Deficiencia de placofilina EB Letal acantolítica EBS Superficialis	Placofilina-1 Desmoplaquina
	Basal	EBS- localizada EBS-Dowling- Meara EBS-otras generalizadas EBS pigmentación moteada EBS-Ogna EBS- migratoria cercenada EBS con distrofia muscular EBS con atresia pilórica EBS- autosómica recesiva EBS- autosómica recesiva nuevo subtipo	Queratina 5 y 14 Queratina 5 y 14 Queratina 5 y 14 Queratina 5 Plectina Queratina 5 Plectina Plectina, Integrina $\alpha 6 \beta 4$ Queratina 14 BPAG1-e
EBJ	EBJ-H		Laminina-332
	EBJ-otras	EBJ-no Herlitz generalizada EBJ-no Herlitz localizada EBJ-con atresia pilórica EBJ-inversa EBJ-comienzo tardío Síndrome LOC	Laminina-332, Colágeno tipo XVII Colágeno tipo XVII Integrina $\alpha 6 \beta 4$ Laminina-332 Laminina-332, cadena $\alpha 3$
EBD	EBD dominante	EBDD- generalizada EBDD-acral EBDD-pretibial EBDD-pruriginosa EBDD-uñas solo EBDD-dermolisis ampollosa del recién nacido	Colágeno tipo VII
	EBD recesiva	EBDR-generalizada severa(Hallopeau-Siemens) EBDR-otras generalizadas EBDR-inversa EBDD-acral EBDR-pretibial EBDR-pruriginosa EBDR-centripetalis EBDR- dermolisis ampollosa del recién nacido	Colágeno tipo VII
SK			FERM-1 (Kindlina-1)

Hasta 2008, bajo la denominación de EB se incluían tres tipos de alteraciones de la unión de los filamentos de queratina a la matriz extracelular, según el plano de ruptura de la piel. En la última revisión se ha incorporado un cuarto tipo, el SK, producida por la alteración de la unión de los filamentos de actina a la MEC (Fine et al, 2008) (tabla 1).

Epidermolisis Bullosa Simple o Epidermolítica (EBS)

La EBS presenta en general una herencia autosómica dominante, aunque también incluye algunos subtipos autosómicos recesivos, de escasa frecuencia.

En EBS la ruptura se produce a nivel intraepidérmico, en la capa basal de la epidermis (figura 6). Las ampollas cicatrizan sin pérdida de tejido. Los afectados suelen experimentar mejoría con el tiempo.

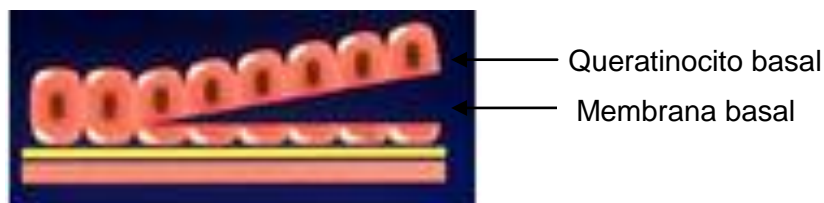


Figura 6. Nivel de ruptura o formación de ampolla en EBS.

La EBS localizada es la forma más común de EB. Suele aparecer en la primera infancia, en forma de ampollas localizadas en zonas predispuestas a trauma (manos, codos, pies), que raramente dejan cicatriz.

La mayoría de los pacientes de EBS presentan un buen pronóstico y una calidad de vida relativamente buena, siempre que realicen de forma constante una adecuada prevención y manejo de las ampollas. Los subtipos raros como la EBS letal acantolítica, la EBS con distrofia muscular y la EBS con atresia pilórica tienen peor pronóstico y pueden conducir a una muerte temprana (Fine et al, 2008).

Epidermolisis Bullosa Juntural o de la Unión (EBJ)

Generalmente, la EBJ presenta una herencia autosómica recesiva, aunque se ha comunicado un subtipo con herencia autosómica dominante (Almaani L et al, 2009).

En la EBJ las ampollas se producen entre los queratinocitos basales y la lámina lucida (figura 7).

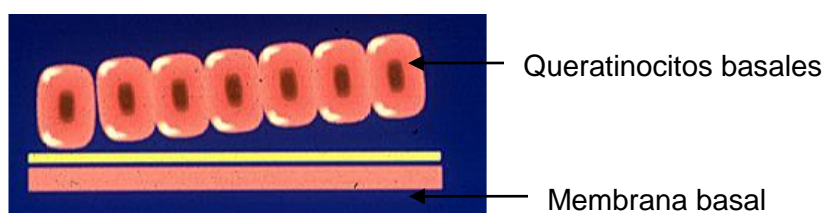


Figura 7. Nivel de ruptura o formación de ampolla en EBJ.

El subtipo Herlitz se debe a la ausencia de expresión de laminina 332 y es letal, de manera que los afectados mueren poco tiempo después del nacimiento. Los recién nacidos presentan grandes zonas de erosión y tejido de granulación alrededor de los orificios (Fine et al, 2008).

Los recién nacidos afectados de EBJ de los subtipos no Herlitz suelen tener mejor pronóstico porque, aunque escasa, hay expresión de las proteínas afectadas. Las ampollas tienden a curar dejando cicatriz y presentan frecuentemente alteraciones de pelo, uñas y esmalte dental.

Epidermolisis Bullosa Distrófica o Dermolítica (EBD)

En la EBD las ampollas surgen por debajo de la lámina densa (figura 8). Al cicatrizar, las sucesivas heridas van originando retracciones en las articulaciones, llegando a dificultar seriamente el movimiento.

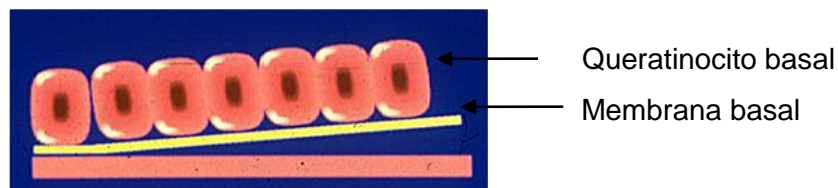


Figura 8. Nivel de ruptura o formación de ampolla en EBD.

La EBD dominante es el segundo tipo de EB más frecuente después de la EBS y como ella su patrón de herencia es autosómico dominante. Los pacientes presentan una expresión reducida de colágeno tipo VII. Su pronóstico y calidad de vida es generalmente bueno (Frew et al, 2009).

Los pacientes de EBD recesiva generalizada severa (EBDR-GS), presentan ampollas congénitas generalizadas que dejan grandes cicatrices y pseudosindactilia. Es el subtipo más grave de EBD recesiva. Los pacientes presentan muchas complicaciones debido a las extensas zonas afectadas. Su esperanza de vida no suele sobrepasar los 30 años por las graves complicaciones o por el desarrollo de carcinoma de células escamosas en las zonas de erosión y de cicatrización repetida (Fine et al, 2008).

Las formas menos severas de EBD recesiva generalizada tienen un pronóstico un poco más favorable y mayor supervivencia.

Síndrome de Kindler (SK)

Recientemente ha sido incluido como cuarto tipo principal dentro de la clasificación de EB. Es el primer síndrome de fragilidad cutánea descubierto, causado por defectos en una proteína, kindlina-1, implicada en la unión entre el citoesqueleto de actina y la matriz extracelular, es decir, por alteración en las adhesiones focales y no en los hemidesmosomas (Fine et al, 2008).

El SK ha sido separado de los otros tres tipos principales de EB, porque típicamente presenta múltiples planos de ruptura (intraepidérmica, juntural o por debajo de la lámina densa) en la piel (Fine et al, 2008). Además, los pacientes presentan características clínicas como la poiquilodermia y la fotosensibilidad que lo distinguen de las otras formas de EB.

2.2.2. Diagnóstico. Generalidades.

El diagnóstico y clasificación de los pacientes de EB se realiza combinando la clínica, la historia familiar y los resultados de laboratorio. Su correcta clasificación es muy importante para prevenir las posibles complicaciones.

Diagnóstico Clínico. Limitaciones

Por sí solos los hallazgos clínicos no ofrecen unos niveles diagnósticos fiables en cuanto a sensibilidad y especificidad (Fine et al, 2000). Esto es debido al solapamiento de síntomas y signos entre los subtipos de EB y a que los rasgos característicos no están siempre presentes a cualquier edad, sino que aparecen en distintos momentos de la vida, facilitando la confusión (Fine et al, 2009).

Por todo ello, el diagnóstico de sospecha proporcionado por la historia y características clínicas de los pacientes, ha de ser confirmado mediante el análisis genético, el mapeo antigénico o el uso de microscopia electrónica de transmisión (MET), antes de realizar cualquier valoración o pronóstico (Fine et al, 2008).

Microscopia Electrónica de Transmisión (MET)

Permite observar el lugar donde se produce la ruptura de la unión dermo-epidérmica y la valoración semicuantitativa de la ultraestructura de la piel. Su principal inconveniente es que hay pocos laboratorios de referencia especializados (Fin et al, 2008).

Mapeo Antigénico. Inmunofluorescencia.

Esta técnica, descrita en 1981, marca las proteínas de interés (en la membrana basal, los queratinocitos y las fibrillas de anclaje), mediante el uso de anticuerpos específicos (Pohla-Gubo et al, 2010). La ausencia, el aumento o la alteración del patrón de marcaje y la localización de este en las ampollas, nos orientan hacia el diagnóstico más probable, que posteriormente se confirma, si es posible, con el estudio genético.

La inmunofluorescencia es una técnica más sencilla, disponible, sensible y específica que la MET. Se recomienda como primer método de diagnóstico de laboratorio a usar en pacientes en los que se sospeche EB, ya que a priori los dermatólogos tienen un acceso más fácil a este recurso y los tejidos son procesados en unas pocas horas (Fine et al, 2008). Es recomendable que la biopsia contenga una ampolla fresca para poder ver dónde se produce la separación de la piel (Pohla-Gubo et al, 2010).

A modo de ejemplo, en las figuras 9, 10 y 11 se muestran los distintos marcajes de inmunofluorescencia en EBS, EBJ y EBD.

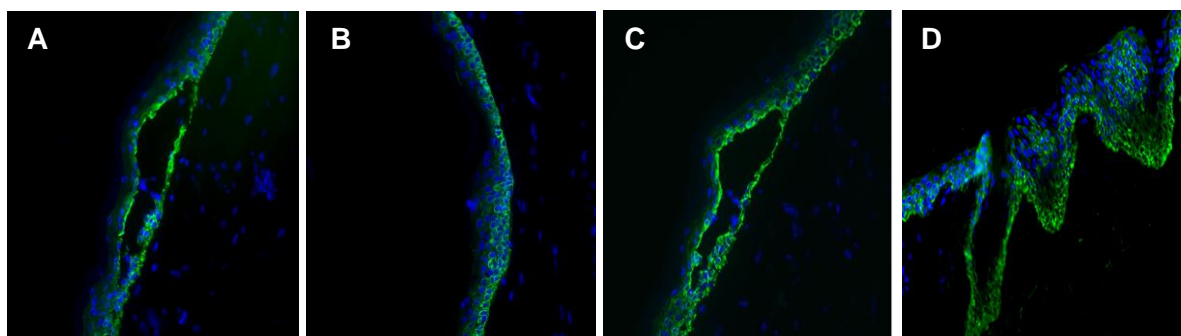


Figura 9. A y C. Inmunofluorescencia en EBS. El mapeo antigénico frente a queratinas 5 (A) y 14 (C) muestra fluorescencia en el techo y suelo de la ampolla. **B y D.** Control sano de queratina 5 (B) y 14 (D).

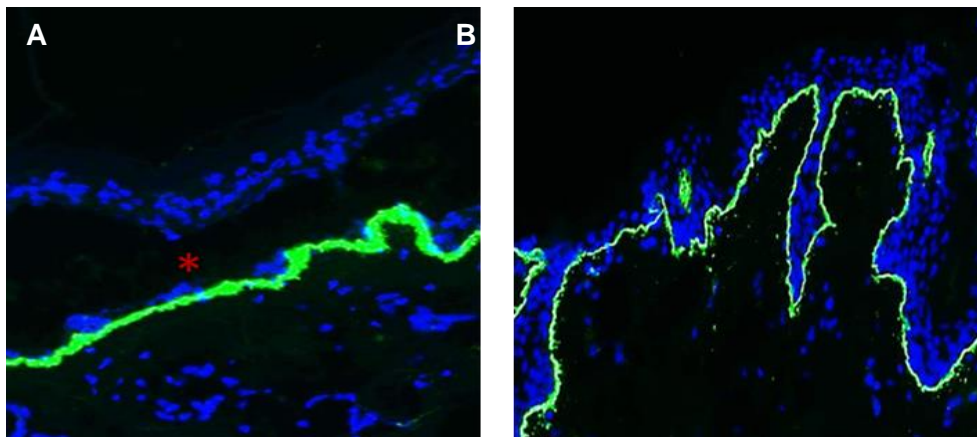


Figura 10. Inmunofluorescencia en EBJ. **A.** El marcaje frente a colágeno VII muestra la fluorescencia en la base de la ampolla (ampolla en lámina lucida, ascerisco). **B** Control sano de colágeno VII.

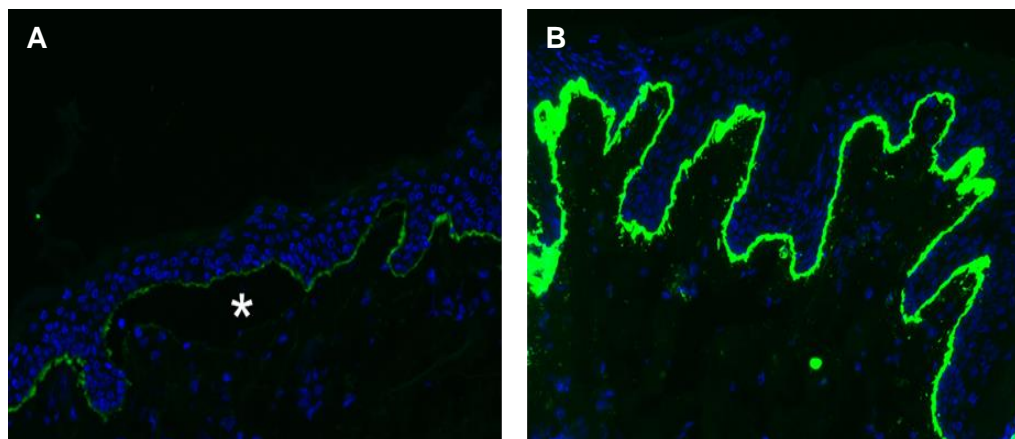


Figura 11. Inmunofluorescencia en EBD. **A** El marcaje frente a colágeno VII muestra la fluorescencia en el techo de la ampolla (ampolla en dermis papilar, debajo de lámina lucida). **B.** Control sano de colágeno VII.

Estudio genético

Los avances en la genética molecular han tenido un gran efecto sobre el diagnóstico de la EB y de otras enfermedades genéticas, al determinar el modo de herencia, el sitio preciso y el tipo de la mutación molecular presente en los pacientes.

El correcto diagnóstico genético de un paciente nos permite conocer su pronóstico, pudiendo ofrecerle las medidas preventivas, de rehabilitación y de tratamiento más adecuadas a su patología. El conocimiento de las bases genéticas de la enfermedad permite realizar un consejo genético, seleccionar células embrionarias no afectadas en el diagnóstico preimplantacional de FIV (Cserhaimi-Friedman et al, 2000) y en la eventual aplicación de terapia génica

Sin embargo, actualmente pocos laboratorios de investigación o comerciales están equipados para llevar a cabo el análisis de las más de 1000 mutaciones identificadas en los al menos 19 genes implicados en la EB.

La búsqueda del gen o de los genes a estudiar en cada paciente se puede simplificar realizando un mapeo antigénico previo que marcará el nivel de ruptura de la ampolla y orientará al tipo de EB más probable.

A pesar de ello los problemas a superar en cada estudio son múltiples. Así por ejemplo algunos subtipos de EB fenotípicamente idénticos, pueden resultar de mutaciones en genes completamente distintos, necesitándose secuenciar varios genes.

Actualmente este estudio se realiza por secuenciación de tipo Sanger, aunque se están incorporado nuevas técnicas como Next-Gen sequencing (NSG), que permite la búsqueda simultánea de mutaciones en distintos genes, mediante paneles que incluyen al menos las secuencias codificantes de todos los genes asociados hasta la fecha a EB (Sánchez-Jimeno et al, 2018).

Aún así, en ocasiones no se detecta la mutación, lo que conlleva el uso de técnicas complementarias como la amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples (MLPA) o la hibridación genómica comparativa basada en microarray (array-CGH) (Sánchez-Jimeno et al, 2018)

2.3. Kindlinas

2.3.1 Generalidades

Las kindlinas (kindlina-1, kindlina-2 y kindlina-3), son un grupo de proteínas adaptadoras citoplasmáticas (Ussar et al, 2006), esenciales para la adhesión y señalización celular mediada por integrinas (Larjava et al, 2008). Están implicadas en enfermedades humanas, genéticas y adquiridas, como el SK, la deficiencia de adhesión leucocitaria y el cáncer.

La proteína kindlina-1, de 677 aminoácidos, es codificada por el gen FERMT1, localizado en el cromosoma 20p12.3 (figura 12), que se expande 50 kb y que contiene 15 exones (Weinstein et al, 2003).

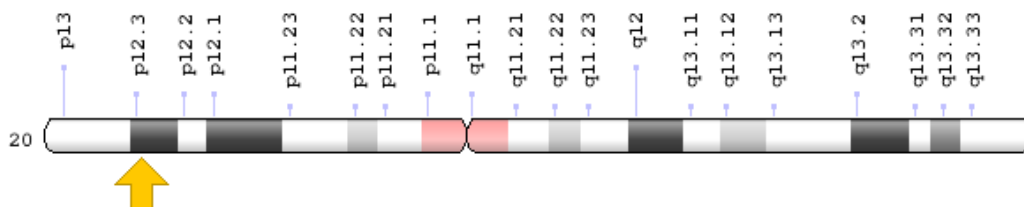


Figura 12. Localización cromosómica del gen FERMT1. Imagen tomada de **Genetics Home Reference**.

La proteína kindlina-2, de 680 aminoácidos, es codificada por el gen FERMT2, localizado en el cromosoma 14q22.1, que se expande 100 kb y que contiene 15 exones (Weinstein et al, 2003).

La proteína kindlina-3, de 667 aminoácidos, es codificada por el gen FERMT3, localizado en el cromosoma 11q13.1 (figura 13), que se expande 20 kb y que contiene 15 exones (Weinstein et al, 2003).

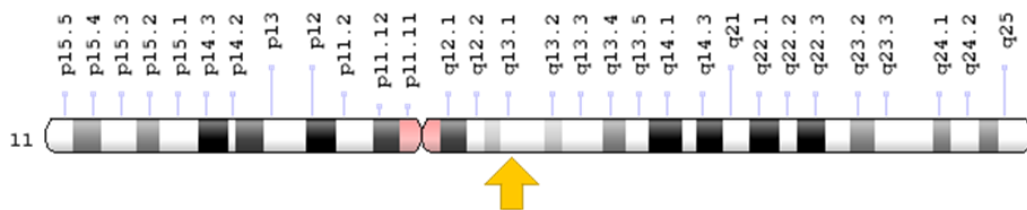


Figura 13. Localización cromosómica del gen FERMT3. Imagen tomada de Genetics Home Reference.

2.3.2. Estructura

A pesar de ser codificadas por genes distintos, las kindlinas conservan una considerable similitud de secuencia y de dominios, entre ellas y entre las distintas especies (Siegel et al, 2003).

La comparación de secuencias entre las distintas kindlinas revela la existencia de una región invariable que corresponde al dominio FERM (figura 14), situado en la región carboxilo terminal de la proteína (Larjava et al, 2008).

El dominio FERM, llamado así por estar presente en las proteínas 4.1, ezrina, radixina y moesina (Four point one, Ezrin, Radixin and Moesin), es muy común en proteínas que interconectan la membrana plasmática con el citoesqueleto celular (Chishti et al, 1998) y que participan en la señalización celular.

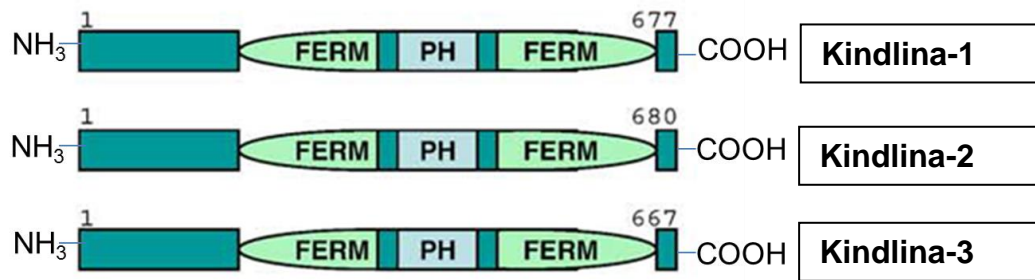


Figura 14. Estructura de kindlina-1, kindlina-2 y kindlina-3. Imagen tomada de **Lo, 2006**.

A diferencia de los dominios FERM clásicos, este se dispone de forma lineal, muestra una duplicación del subdominio F1 (F0), que podría estar implicado en interacciones proteína-proteína (Goult et al, 2009) y un inserto en el subdominio F1 mediante el que se une a los fosfolípidos de membrana cargados negativamente (Bouaouina et al, 2012). El dominio PH (pleckstrin homology), inserto en el subdominio F2, permite la unión a lípidos de la membrana citoplasmática, tras lo cual la proteína que lo contiene cambia su localización intracelular o actividad enzimática y ejecuta una serie de respuestas fisiológicas (Itoh y Takenawa, 2002). Mediante el subdominio F3 kindlina interacciona con la cola beta de integrina (Bouaouina et al, 2012) (figura 15).

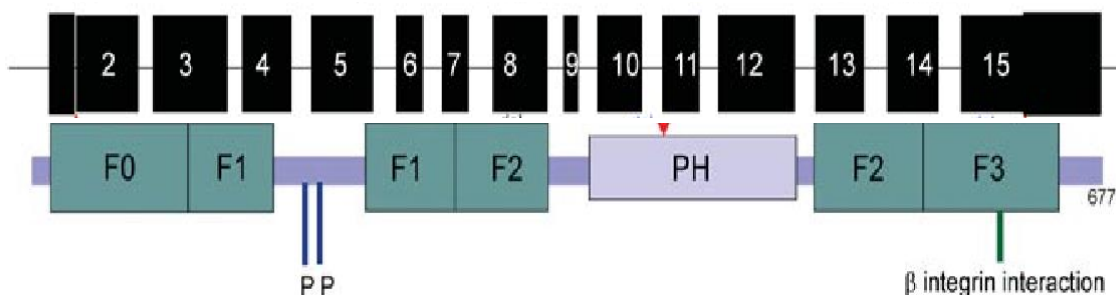


Figura 15. Representación esquemática de los 15 exones del gen FERMT1 y del dominio FERM de kindlina-1, mostrando los exones codificantes de cada subdominio. Imagen adaptada de **Has et al, 2011**.

2.3.3. Isoformas

El gen FERMT1 da lugar a un transcrito de 4,9 kb y a una proteína de 677 aa, con un peso molecular calculado de 77,3 kDa (Jobard et al, 2003; Siegel et al, 2003).

En el colon se ha identificado además una isoforma corta de 43 kDa y 352 aa (figura 16), generada por una variante de splicing en la que el intrón 7 se incluye en la secuencia codificante, lo que produce un codón stop prematuro (Siegel et al, 2003; Kern et al, 2007).

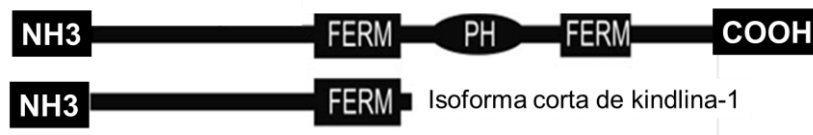


Figura 16. La **isoforma corta** ha sido detectada en cultivos de células epiteliales intestinales y se cree que contiene la región N-terminal y el dominio FERM. Imagen tomada de **Kern et al, 2007**.

La proteína kindlina-2 presenta tres isoformas de 687, 680 y 633 aa y kindlina-3 dos más de 667 y 663 aa.

2.3.4. Patrones de expresión y localización

Kindlina-1, -2 y -3 tienen un patrón de expresión específico a nivel celular y de tejido (Siegel et al 2003, Usar et al 2006), lo que sugiere la existencia de funciones específicas para cada una de ellas.

2.3.4.1. Kindlina-1

Localización tisular. La proteína kindlina-1 es una proteína específica del epitelio. Se expresa en la piel, tejido periodontal y colon (Herz et al, 2006; Kern et al, 2007; Ussar et al, 2008; Petricca et al, 2009)

En la piel humana sana, la tinción con un anticuerpo contra la región C-terminal de kindlina-1 (figura 17), revela su localización en los queratinocitos basales de la epidermis, sin marcaje en la dermis (Siegel et al, 2003; Herz et al, 2006; Lai-cheong et al, 2008).

Kindlina-1 está también presente en las zonas basolaterales y el citoplasma de las células epiteliales del colon (Siegel et al, 2003; Kern et al, 2007; Ussar et al, 2008).

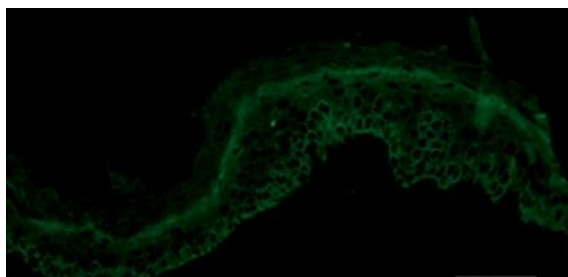


Figura 17. Expresión y localización de kindlina-1 en piel sana, utilizando el Ac antikindlina-1. Se observa una expresión panepidérmica, más acentuada en los queratinocitos basales, en contacto con la membrana basal. Imagen tomada de **Lai-Cheong et al, 2008**.

Localización subcelular. En los queratinocitos humanos sanos cultivados, kindlina-1 se encuentra en la periferia celular, cerca de los filamentos de actina y de vinculina (figura 18), ambos pertenecientes a las adhesiones focales, lo que sugiere su implicación en esta estructura (Siegel et al, 2003; Lai-Cheong et al, 2009). También se ha demostrado la localización nuclear de kindlina -1, aunque aún se desconoce su significado (Lai-Cheong et al, 2008).

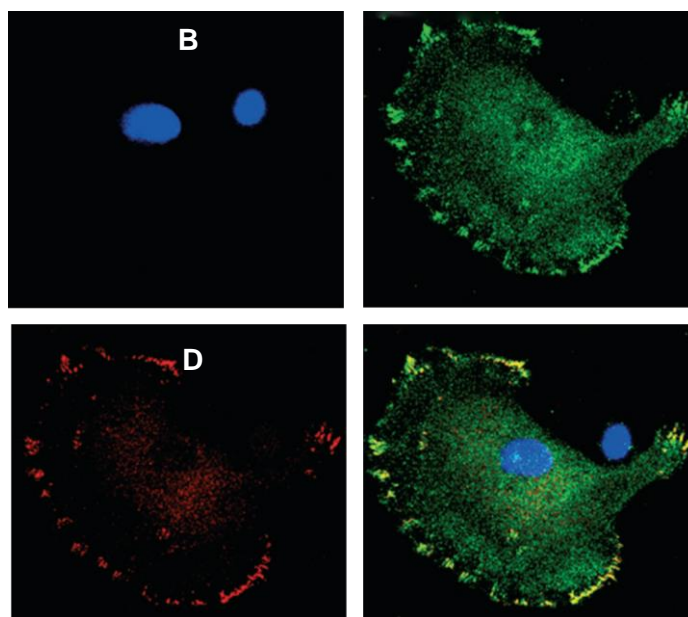


Figura 18. Colocalización de kindlina-1 y vinculina. **A** Tinción del núcleo con DAPI. **B** Tinción con Ac antikindlina-1. Se marca el citoplasma y especialmente la periferia celular. **C** Tinción frente a vinculina, localizada en la periferia celular. **D** Solapamiento de las imágenes anteriores en la que se observa la colocación de kindlina-1 y vinculina. Imagen tomada de **Lai-Cheong et al, 2008**.

2.3.4.2. Kindlina-2

Localización tisular. La proteína kindlina-2 se expresa en los tejidos sólidos de origen mesenquimal como corazón, pulmón, músculo esquelético, riñones, vejiga, estómago y piel (Usar et al, 2006; Montanez et al, 2008). Está presente en fibroblastos, células musculares, epiteliales y endoteliales (Rogalski et al, 2000; Mackinnon et al, 2002).

En la piel de ratón, kindlina-2 se expresa más en la dermis que en la epidermis (Ussar et al, 2006). Kindlina-2 es la única isoforma de kindlina expresada en las células madre de embrión (Montanez et al, 2008).

Localización subcelular. En las células epiteliales en cultivo, kindlina-1 y 2 se co-localizan en las AF (Lai-Cheong et al, 2008), mientras que solo kindlina-2 se co-localiza con E-cadherina en las uniones intercelulares de los queratinocitos diferenciados (Ussar et al, 2006). In vivo, kindlina-2 solo se localiza en las uniones célula-célula (Ussar et al, 2008).

En algunos tipos celulares, distintos a los queratinocitos, también se ha localizado una señal nuclear de kindlina-2, cuyo significado igualmente se desconoce (Lai-Cheong et al, 2008; Ussar et al, 2008).

2.3.4.3. Kindlina-3

Localización tisular. La proteína kindlina-3 se expresa específicamente en plaquetas, eritrocitos, leucocitos y especialmente en megacariocitos. Por lo tanto se expresa intensamente en bazo, timo y ganglios linfáticos, escasamente en colon, cerebro y músculo esquelético y no muestra expresión en queratinocitos y fibroblastos en cultivo (Siegel et al, 2003; Passini et al, 2006; Ussar et al, 2006). Además se ha demostrado su presencia en células endoteliales (Ussar et al, 2006; Bialkowska et al, 2010).

Localización subcelular. En las células en cultivo kindlina-3 se ha localizado junto a integrina en los podosomas (estructuras de unión de las células hematopoyéticas) (Ussar et al, 2006).

2.3.5. Proteínas de unión a kindlina

Las kindlinas, al carecer de dominios catalíticos, actúan como proteínas adaptadoras, mediando en las interacciones proteína-proteína (Larjava et al, 2008).

Kindlina-1 se une a las subunidades $\beta 1$ y $\beta 3$ de integrina (Ussar et al, 2008; Harburger et al, 2009). También podría interactuar con migfilina, kindlina-2 (Lai-Cheong et al, 2008), α -actinina y FAK (Has et al, 2009).

Kindlina-2 se une a las subunidades $\beta 1$ y $\beta 3$ de integrina (Kloeker et al, 2004; Montanez et al, 2008; Harburger et al, 2009), recluta a migfilina en las adhesiones focales (Tu et al, 2003) y requiere de ILK (integrin-linked kinase) para su localización en dichas estructuras (Mackinnon et al, 2002; Tu et al, 2003; Montanez et al, 2008). Aunque, como se ha mencionado antes, kindlina-2 podría interactuar con kindlina-1 (Lai-Cheong et al, 2008), esto no implica que pueda compensar su pérdida (Ussar et al, 2008).

Kindlina-3 se une a las colas citoplasmáticas de las subunidades $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 3$ de integrina (Moser et al, 2009) y coimmunoprecipita con migfilina, lo cual puede implicar que haya interacción entre ellas (Malinin et al, 2009).

2.3.6. Funciones

La unión célula-matriz extracelular, mediada por integrina, requiere su activación y una reorganización espacial (Larjava et al, 2008). Las kindlinas se unen directamente a la cola citoplasmática de la subunidad β de integrina, cooperando con talina en su activación (figura 19).

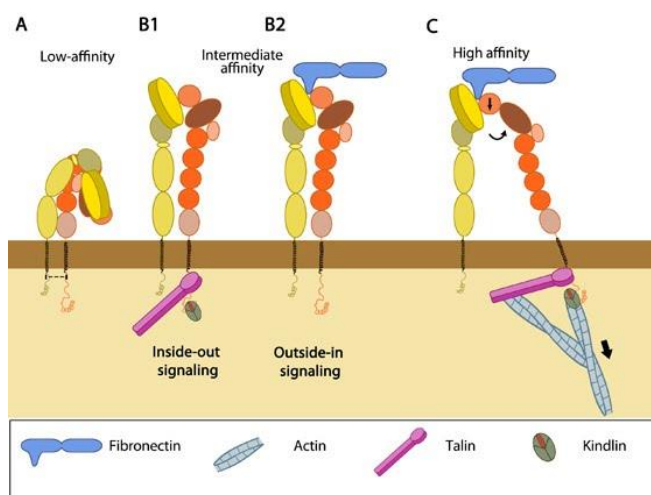


Figura 19. Activación de la proteína integrina. La integrina pasa de un estado de inactividad (baja afinidad por sus ligandos) a actividad (alta afinidad) cuando sus dominios extracelulares se extienden. Imagen tomada de www.mechanobio.info/modules/go-0033622.

Además, al interactuar con proteínas de las adhesiones focales como migfilina e ILK, promueven la reorganización del citoesqueleto celular (Larjava et al, 2008).

Varios estudios funcionales han puesto de manifiesto que una vez que las integrinas se han unido a sus ligandos, se producen señales que son conducidas por las kindlinas hasta los compartimentos celulares (señalización outside-inside) (Larjava et al, 2008; Moser et al, 2009). Estas señales dan lugar a la reorganización del citoesqueleto, con el fin de facilitar la difusión, migración supervivencia, proliferación, motilidad y diferenciación celular (Meves et al, 2009).

La proteína kindlina-1 es necesaria para la activación de las Rho GTPasas Rac1, Cdc42 y Rho A, que regulan las protusiones celulares (lamelipodio y filipodio), el correcto depósito de proteínas como laminina-332 en la membrana basal y el mantenimiento de las células stem (Has et al, 2009).

2.3.7. Enfermedades. Modelos animales y celulares. Cáncer

2.3.7.1. Kindlina-1

En humanos, la pérdida de kindlina-1 da lugar al SK (Jobard et al, 2003; Siegel et al, 2003), caracterizado por la presencia de ampollas, poiquilodermia, atrofia de la piel y fotosensibilidad (Kindler, 1954).

La falta de kindlina-1 ocasiona la alteración de las funciones celulares relacionadas con integrina, como la adhesión, proliferación, polaridad y motilidad de las células epidérmicas, siendo esta la base de la fragilidad y de la atrofia de la piel (Kloeber et al, 2004; Herz et al, 2006; Has et al, 2009).

Ussar y colaboradores generaron un modelo de ratón *knockout* para el gen FERMT1, que conducía a la pérdida completa de la proteína kindlina-1. Los ratones, sanos al nacer, desarrollaron en las primeras 48 horas de vida una atrofia

epidérmica severa sin ampollas (incluso a nivel microscópico) y una disfunción letal del epitelio intestinal (Ussar et al, 2008).

El fenotipo intestinal es similar, aunque más severo que el visto en SK, probablemente porque el intestino del ratón recién nacido es más inmaduro, lo que lo convierte en más vulnerable (Hauck et al, 2005). El fenotipo del ratón nos demuestra que kindlina-1 y 2 no tienen funciones redundantes ya que kindlina- 2 también se expresa en las células epiteliales intestinales (Ussar et al, 2008).

In vitro, los queratinocitos SK humanos, no expresan kindlina-1, aunque en el estudio de proteínas (Western Blot) se observan “bandas” que podrían corresponder a proteínas resultantes de splicing alternativos (Herz et al, 2006; Has et al, 2009). Los queratinocitos SK y Kindlina *null* (queratinocitos modificados), presentan menor tamaño, formas aberrantes, una red cortical de actina fina, múltiples protusiones celulares con distintas orientaciones, movimientos lentos, una tasa de proliferación reducida y requieren más tiempo para cerrar una herida, en comparación con los queratinocitos normales. Además muestran una alteración en el ensamblaje de los hemidesmosomas, una menor adhesión a las proteínas de la matriz extracelular, un depósito anormal de laminina-332 en forma de “pétalos de flor” y una menor eficiencia en la formación de colonias (Herz et al, 2006; Has et al, 2009, Lai-Cheong et al, 2009). Estos defectos se deben, al menos en parte, al fallo en la transducción de señales anteriormente descrita (Has et al, 2009).

2.3.7.2. Kindlina-2

La pérdida de función de kindlina-2 es probablemente letal en el embrión humano y en consecuencia no se conoce ninguna enfermedad humana asociada a esta proteína (Ussar et al, 2006; Montanez et al, 2008; Lai-Cheong et al, 2009).

Los ratones *knockout* de kindlina-2 mueren en el periodo peri-implantacional. Sin embargo el modelo de ratón heterocigoto es viable y no presenta alteraciones.

La deficiencia de kindlina-2 parece afectar a la formación de las uniones intercelulares y a las adhesiones focales de una manera drástica, con mayor impacto en la motilidad celular que la deficiencia de kindlina-1 (He et al, 2011). Esto sugiere que las alteraciones en las células sin kindlina-2 pueden no deberse solo al defecto en la activación de integrina (He et al, 2011).

2.3.7.3. Kindlina-3.

La identificación de mutaciones en kindlina-3 como causante de LAD-III/Variante LAD1, una enfermedad con hemorragias severas y alteraciones de la inmunidad, afianzó el papel de las kindlinas como reguladoras de la adhesión celular (Mory et al, 2008; Kuijpers et al, 2009; Malinin et al, 2009). Esta enfermedad es consecuencia de los defectos combinados en la activación de las integrinas $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 3$ en plaquetas, neutrófilos y linfocitos, a pesar de la expresión normal de las integrinas (Mory et al, 2008).

El ratón knockout de FERMT3 sufre hemorragias severas en múltiples localizaciones, alteraciones en la migración de leucocitos a las regiones inflamadas, alteraciones en el esqueleto de la membrana eritrocitaria y osteopetrosis, muriendo una semana después de nacer. Las hemorragias son debidas a una activación defectuosa de la integrina $\alpha IIb\beta 3$ (Moser et al, 2008).

In vitro, la integrina $\alpha IIb\beta 3$ de plaquetas kindlina-3 *null*, no puede ser activada en respuesta a sus agonistas (Moser et al, 2008). *In vitro*, los PMN de kindlina-3 *-/-* no pueden migrar ni unirse al fibrinógeno soluble (ligando para integrinas $\beta 2$ y $\beta 3$).

2.3.7.4. Kindlinas y cáncer

La ausencia o la sobreexpresión de kindlinas puede ser importante en el inicio y progresión del cáncer.

Se ha informado un aumento del riesgo de carcinoma de células escamosas en los pacientes de SK (Lai-Cheong et al, 2009; Has et al, 2011) y aunque se desconoce el mecanismo por el que esto se produce se sospecha que las erosiones repetidas y prolongadas podrían inducir este tipo de cáncer (Mizutani et al, 2012).

Se ha encontrado sobreexpresión de la proteína kindlina-1 en tumores de pulmón y colon, en pacientes sin mutaciones en el gen FERMT1 (Weinstein et al, 2003). Sabemos que el factor de crecimiento TGF β 1, que aumenta la movilidad de las células tumorales, induce la expresión de kindlina-1 (Kloeber et al, 2004). *In vitro*, el incremento de la expresión de kindlina origina un aumento de la difusión celular, lo que correlaciona con la transición de epitelio a mesénquima, un importante paso para la carcinogénesis (Kloeber et al, 2004). Además, las células presentan un reordenamiento del citoesqueleto de actina que recuerda al de las células fibroblásticas (Lai-Cheong et al, 2009).

La proteína kindlina-2 también puede participar en la carcinogénesis (Shi y Wu, 2008). La transformación maligna de las células puede alterar los patrones de expresión de kindlina-2, presentando esta una expresión variable en tumores de mama (Gozgit et al, 2006), leiomiomas y leiomiomas (Kato et al, 2004).

Por último se han encontrado altos niveles de kindlina- 3 en varios linfomas de células B (Boyd et al, 2003).

2.4. Síndrome de Kindler

2.4.1. Características generales

El SK (OMIM 173650) es una genodermatosis rara, de prevalencia desconocida y herencia autosómica recesiva, debida a mutaciones en los dos alelos del gen FERMT1 (OMIM 607900), que codifica la proteína kindlina-1 (Jobard et al, 2003; Siegel et al, 2003).

Hasta la fecha se han informado 250 pacientes y 75 mutaciones distribuidas a lo largo del gen (The Human Gene Database). La mayor parte de estas mutaciones conducen al final prematuro de la transcripción y a la pérdida de la función de la proteína (Lai-Cheong y McGrath, 2010; Has et al, 2011; Techanukul et al, 2011).

2.4.2 Características clínicas

En 1954, la Dra. Theresa Kindler describió el caso de una niña de 14 años con ampollas congénitas en manos y pies (Kindler, 1954). En la infancia, la paciente desarrolló fotosensibilidad y atrofia cutánea difusa. Sus encías sangraban fácilmente y la piel del dorso de las manos y pies era delgada y de apariencia arrugada (figura 20). A los 10 años cesaron las ampollas y la sensibilidad al sol, pero la piel permaneció frágil y delgada.



Figura 20. Primer paciente descrito de SK. En la foto se observa una pigmentación moteada en la cara y el cuello, con hipo e hiperpigmentación, que progresivamente avanzó a zonas expuestas y no expuestas al sol. Imagen tomada de Kindler, 1954.

El síntoma predominante del SK es la presencia de **ampollas**, en ocasiones hemorrágicas, generalmente presentes desde el nacimiento y principalmente en zonas acras (figura 21). Se producen de forma espontánea o inducidas por un pequeño trauma o exposición al sol (Kindler, 1954; Hovnanian et al, 1989; Jobard et al, 2003; Siegel et al, 2003), siendo este el motivo por cual el SK se incluye en la clasificación de EB (Has et al, 2011).

Generalmente las ampollas no dejan cicatrices y suelen disminuir su frecuencia hacia el final de la infancia, aunque la piel se mantiene frágil y se ve fácilmente afectada ante pequeños traumas (Hovnanian et al, 1989; Lai-Cheong et al, 2009).



Figura 21. Ampolla en la extremidad inferior de un paciente de SK.
Imagen tomada de Lai-Cheong et al, 2008.

La mayoría de los pacientes presentan desde la infancia diversos grados de **fotosensibilidad** (figura 22) (Hovnanian et al, 1989; Lai-Cheong et al, 2007), que mejora en la pubertad (Lanschuetzer et al, 2003), coincidiendo con una menor formación de ampollas (Hovnanian et al, 1989). La fotosensibilidad es una característica típica del SK, que no está presente en otros tipos de EB. Puede manifestarse como un enrojecimiento de la piel tras una mínima exposición solar o como quemaduras.



Figura 22. Marcado eritema facial en un paciente de SK. Imagen tomada de Mallo et al, 2005.

Otra característica frecuente del SK es la **poiquilodermia**, que se define como la presencia de placas de piel atrófica, salpicadas de telangiectasias, en las que se alternan áreas de hipo e hiperpigmentación, dando a la piel un aspecto moteado. La poiquilodermia aparece primero en la cara y el cuello, extendiéndose progresivamente a pecho, parte superior de la espalda, abdomen, parte superior e interior de brazos y muslos, axilas e ingles, brazos y piernas, donde la piel se muestra pigmentada, atrófica, fina, arrugada y sin teleangiectasias (Hovnanian et al, 1989) (figura 23).



Figura 23. Poiquilodermia generalizada en el SK. Imagen tomada de Natsuga et al, 2011.

En los pacientes de SK la **atrofia** cutánea es muy llamativa desde la niñez. La piel del dorso de manos y pies aparece delgada y arrugada, en “papel de cigarrillo” (figura 24). La atrofia también se observa en abdomen, muslos, codos y rodillas (Hovnanian et al, 1989).



Figura 24. Atrofia cutánea en el pie de un niño de cuatro años. Imagen tomada de **Mendes et al, 2012**.

El SK incluye un amplio abanico de alteraciones de la **mucosa bucal** como inflamación crónica, atrofia y erosiones en la mucosa, pigmentación en los labios, leucoqueratosis en mucosa oral y labial, sangrado gingival, gingivitis (figura 25) y periodontitis severa con pérdida de dientes (Kindler, 1954; Siegel et al, 2003; Wiebe et al, 2008).



Figura 25. Inflamación gingival, sangrado, placas y caries. Imagen tomada de **Lai-Cheong et al, 2008**.

Muchos pacientes desarrollan signos y síntomas que reflejan la **fibrosis mucocutánea** existente (Heinemann et al, 2011). Así pueden aparecer: restricción en la apertura de la boca y maloclusión (Has et al, 2008), fimosis (Penagos et al, 2004), estenosis de las mucosas esofágica, anal, vaginal y uretral (Ashton, 2004; Sethuraman et al, 2005), pseudosindactilia y bandas constrictivas que pueden llevar la pérdida de dedos (figura 26) (Arita et al, 2007; Hovnanian et al 1989, Lanschuetzer et al, 2003).

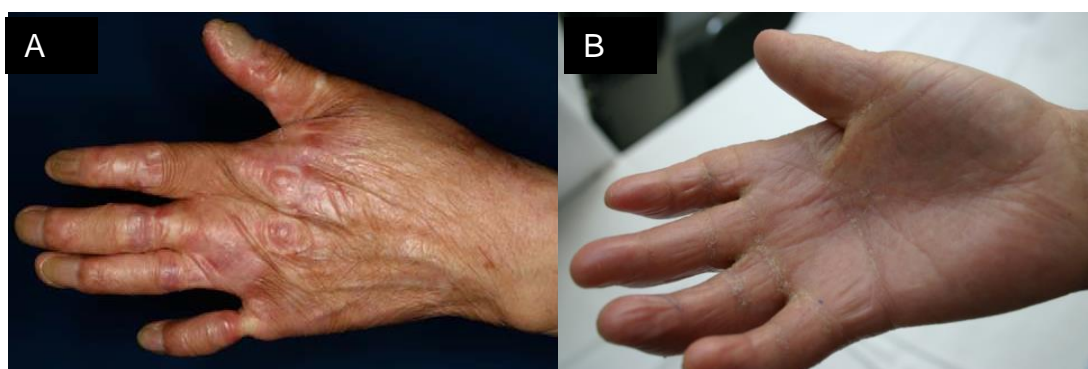


Figura 26. Fibrosis cutánea en SK. **A.** Se observa una brida fibrosa en el dedo meñique que puede llevar a su amputación. Se aprecia también atrofia cutánea y distrofia ungueal. Imagen tomada de **Natsuga et al, 2011**. **B.** En los pacientes de SK es muy frecuente la presencia de queratodermia palmoplantar, es decir, de hiperqueratosis que da a la piel un aspecto engrosado, áspero y descamado como se observa en la imagen. Podemos ver también una pérdida de las crestas epidérmicas de los dedos.

A nivel **ocular** los pacientes pueden mostrar conjuntivitis, cicatrices conjuntivales, erosión corneal y ectropion (Jen M y Nallasamy S, 2016).

Los pacientes con una afectación importante de las mucosas presentan un peor pronóstico (Nofal et al, 2008).

Algunos pacientes presentan cuadros de estreñimiento y colitis severa, semejantes a colitis ulcerosa (Kern et al, 2007; Freeman et al, 2008). En la literatura se encuentran muy pocos pacientes afectados de **síntomas intestinales**, aunque esto puede ser debido al infradiagnóstico del SK (Sadler et al, 2006). La severidad de los síntomas intestinales varía entre pacientes. La mayoría desarrollan los primeros síntomas cuando son adultos, aunque también se ha descrito una forma neonatal severa (Sadler et al, 2006).

El SK se asocia a un aumento de riesgo de desarrollar carcinoma de células escamosas, habiéndose informado hasta ahora un total de 14 casos de carcinoma o de lesiones premalignas., la mayoría de ellos múltiples y localizados en la cavidad oral y en zonas acras (figura 27).



Figura 27. Carcinoma de células escamosas en tobillo de paciente SK.
Imagen tomada de Arita et al, 2007.

2.4.3. Diagnóstico de SK

El diagnóstico de los pacientes se realiza combinando las características clínicas, la historia familiar y los resultados de laboratorio. Su correcta clasificación es muy importante para prevenir en la medida de lo posible las complicaciones.

Diagnóstico Clínico.

Por sí solos los hallazgos clínicos no ofrecen unos niveles fiables de sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de SK. Esto es debido al solapamiento de síntomas y signos con otros tipos de EB y otras enfermedades caracterizadas por ampollas y/o poiquilodermia y a que los rasgos característicos no están siempre presentes a cualquier edad, sino que aparecen en distintos momentos de la vida, facilitando la confusión (Fine et al, 2009).

En el año 2005 Fischer y colaboradores, clasificaron los signos clínicos de SK en criterios mayores y menores para facilitar su diagnóstico. Los criterios mayores comprenden: ampollas en zonas acras en la infancia, poiquilodermia progresiva, atrofia de la piel, fotosensibilidad anormal, fragilidad y/o inflamación gingival. Los criterios menores son la sindactilia y la afectación de mucosas (estenosis anal, esofágica, uretral, laríngea).

La presencia de cuatro criterios mayores conlleva el diagnóstico de SK. La presencia de tres mayores y dos menores hace el diagnóstico “probable” y la presencia de dos criterios mayores y dos menores o de síntomas asociados hace el diagnóstico “posible” (Fischer et al, 2005).

Microscopia óptica

El examen mediante microscopía de luz convencional de una biopsia de piel tomada de una zona de poiquilodermia y teñida con hematoxilina-eosina muestra atrofia de la epidermis, hiperqueratosis, degeneración vacuolar de las células basales epidérmicas, ruptura de la membrana basal y liberación de pigmento a la dermis, con presencia de melanófagos (figura 28). También son típicos los queratinocitos apoptóticos y los cuerpos de queratina. En la parte superior de la dermis pueden ser encontrarse teleangiectasias y un infiltrado linfohistiocitario moderado congruente con la poiquilodermia (Hovnanian et al, 1989; Jobard et al, 2003).

Mediante tinciones específicas como la de Van Gieson, se puede encontrar disrupción, pérdida y degeneración del tejido elástico a lo largo de la dermis papilar (figura 29).

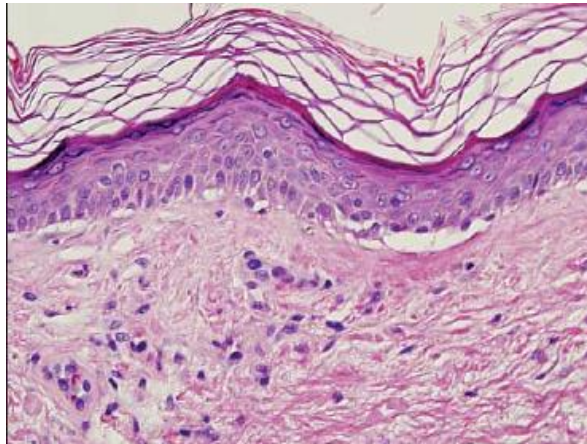


Figura 28. Histología de una biopsia de piel de un paciente de SK. Se observa aplanamiento de la epidermis, degeneración vacuolar de los queratinocitos basales, áreas de separación dermoepidérmica y un infiltrado linfocitario en la dermis. Hematoxilina-eosina, 200x. Imagen tomada de **Burch et al, 2006**.

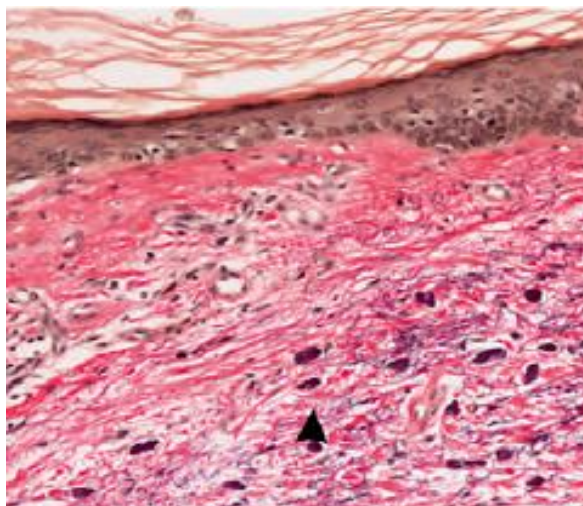


Figura 29. Tinción de Van Gieson en una biopsia de piel de un paciente de SK. La flecha indica las fibras elásticas degeneradas. Imagen tomada de **Has et al 2010**.

Microscopia Electrónica de Transmisión (MET)

La MET de un paciente de SK generalmente muestra una extensa reduplicación de la lámina densa a lo largo de la unión dermo-epidérmica y múltiples escisiones donde dicha lámina se ha destruido (Shimizu et al, 1997). Las escisiones van asociadas a un depósito denso de colágeno, lo que sugiere que a la ruptura le sigue un intento de remodelación y reparación del tejido (Burch et al, 2006). Los hemidesmosomas y las fibrillas de anclaje fueron descritas inicialmente como normales (Shimizu et al, 1997; Jobard et al, 2003), aunque se han informado hemidesmosomas hipoplásicos y en menor cuantía de la haitual (Lai-Cheong et al, 2009).

En la piel con ampolla, el nivel de ruptura es variable, pudiendo encontrarse en la unión dermo-epidérmica en la parte inferior de los queratinocitos basales, en el interior de la lámina lúcida o por debajo de la lámina densa (figura 30) (Hovnanian et al, 1989; Haber y Hanna, 1996; Shimizu et al, 1997).

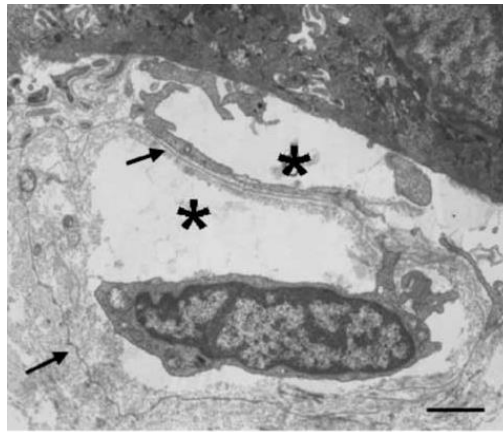


Figura 30. Microscopia electrónica tomada de un neonato de 5 días con SK. Muestra ampollas por encima y por debajo de la lámina densa (asteriscos), así como su reduplicación (flechas). Imagen tomada de **Fassihi et al, 2005**.

Mapeo Antigénico

En general el mapeo antigénico de las muestras de los pacientes de SK ofrece un marcaje ancho y reticulado frente a laminina-332, colágeno tipo IV, tipo VII y tipo XVII (figura 31) (Shimizu et al, 1997; Lanschuetzer et al, 2003; Lai-Cheong et al, 2009), que se corresponde con la reduplicación de la lámina densa observada en la microscopia electrónica (Ashton et al, 2004). Sin embargo hemos de tener en cuenta que esta reduplicación puede estar presente también en algunos pacientes con porfiria, lupus y disqueratosis congénita o estar ausente, posiblemente porque la zona en la que se ha tomado la muestra esté sana (Lanschuetzer et al, 2003).

En el marcaje frente a colágeno tipo VII se puede observar que este se sitúa en zonas más profundas a lo habitual en el tejido conectivo (Hovnanian et al, 1989; Wiebe y Larjava, 1999). El marcaje frente a integrina $\beta 4$ y $\alpha 6$, puede mostrar pequeños huecos producidos por la apoptosis de queratinocitos basales (Shimizu et al, 1997; Lanschuetzer et al, 2003).

El anticuerpo anti-kindlina-1 carboxi-terminal, podría ser usado para el diagnóstico, pero su valor está cuestionado debido a la variabilidad de la intensidad del marcaje que se obtiene con él (Lai-Cheong et al, 2008). Algunos pacientes SK, confirmados mediante estudio genético, muestran un marcaje normal con dicho anticuerpo. Esto podría deberse a la presencia en esos pacientes de proteínas truncadas que conservan la región carboxi-terminal (Lai-Cheong et al, 2008).

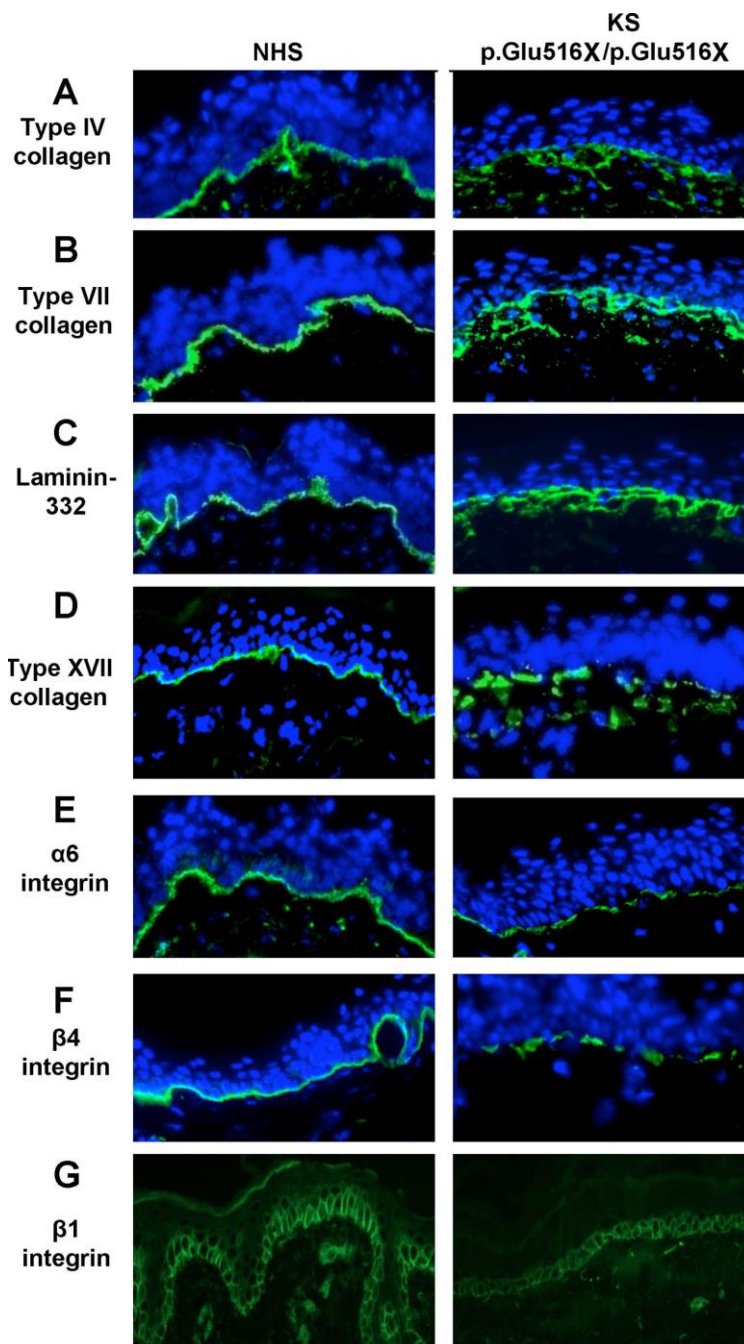


Figura 31. Mapeo antigénico de piel sana y de piel de un paciente SK. Se observa la reduplicación de la lámina densa frente a laminina-332, colágeno tipo IV, tipo VII y tipo XVII. El marcaje frente a integrinas $\alpha 6$ y $\beta 4$ se muestra fragmentado, posiblemente por la apoptosis de queratinocitos basales. Imagen tomada de **Lai-Cheong et al, 2009**.

Estudio Genético

En la actualidad, la identificación de las mutaciones genéticas, es la prueba definitiva para el diagnóstico de SK (Jobard et al, 2003; Siegel et al, 2003; Lai-Cheong et al, 2009).

El gen FERMT1, contiene 15 exones, con la metionina inicial en el residuo 359 del exon 2 (el exon 1 no es codificante) y el codon stop en el exon 15 (Jobard et al, 2003; Siegel et al, 2003). Los exones tienen un tamaño comprendido entre 47 y 234 pb, con un marco de lectura de 2034 pb.

Desde la identificación del gen FERMT1 en 2003, se han descrito 75 variantes en 250 pacientes, que incluyen mutaciones puntuales (missense, nonsense), de splicing, con cambio en el marco de lectura y grandes inserciones y delecione (figura 32) (Youssefian et al, 2015).

Los pacientes en general son homocigotos para una mutación (Has et al, 2011) y en ellos se observa un predominio de descendientes de matrimonios consanguíneos u originarios de poblaciones aisladas como la que centra parte de este trabajo (Has et al, 2011).

Algunas mutaciones parecen afectar a “hot spots” (zonas con mayor predisposición a la mutación), o haber ocurrido hace mucho tiempo diseminándose posteriormente entre las poblaciones (Has et al, 2011).

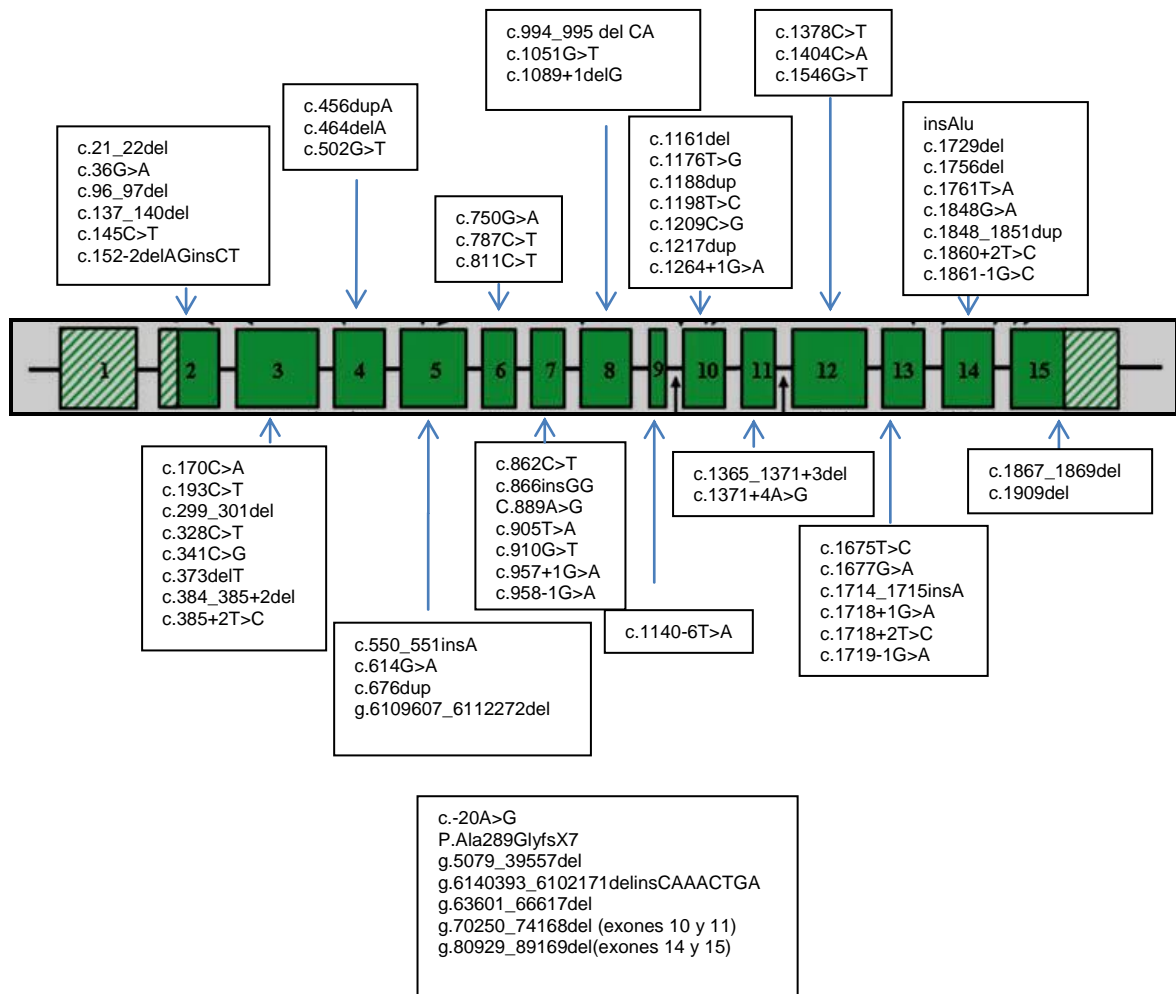


Figura 32. Mutaciones en el gen *FERMT1* asociadas a SK. Se incluyen 70 de las 75 variantes descritas. Esquema adaptado de Lai-Cheong et al, 2010.

2.4.4. Diagnóstico diferencial

En la paciente descrita por la Dr. Kindler se combinaban rasgos de dos enfermedades ya descritas en aquel momento, la EB y la Poiquilodermia Congénita (Kindler, 1954).

Clínicamente, en pacientes jóvenes, puede ser confundida con EB distrófica, aunque la resolución espontánea y parcial de las ampollas y la presencia de fotosensibilidad junto al progresivo desarrollo de poiquilodermia hace que se reconsidere el diagnóstico inicial (Fine et al, 2000; Jobard et al, 2003; Ashton et al, 2004).

Entre los diagnósticos diferenciales se han de incluir la EB simple con pigmentación moteada, la EB juncional, el Síndrome de Rothmund-Thomson, el xeroderma pigmentosum y la esclerodermia sistémica (Lai-Cheong et al, 2010; Has et al, 2011)

2.4.5. Tratamiento

Hasta la fecha el tratamiento es solo sintomático, sin embargo, es necesario el reconocimiento temprano de la enfermedad para adaptar las costumbres y cuidados personales a fin de minimizar las complicaciones y para realizar el consejo genético.

Los neonatos con SK han de ser cogidos con cuidado por la facilidad con que se pueden producir ampollas.

Los pacientes suelen tener una piel seca que produce prurito, por lo que es necesaria la aplicación regular de cremas emolientes. En estos pacientes una breve exposición solar suele producir eritema (Thomson et al, 2006), por lo que es importante el uso de protección solar.

Debido al alto riesgo de padecer carcinoma de células escamosas, se recomienda hacer revisiones anuales en busca de lesiones premalignas.

La frecuencia con que padecen gingivitis y periodontitis agresiva hace necesario un buen cuidado dental y revisiones.

En pacientes con disfagia pueden ser necesarias las dilataciones del esófago (Mansur et al, 2007; Martignago et al, 2007). En casos de disfunción esofágica severa puede ser necesaria nutrición parenteral de forma temporal (Mansur et al, 2007).

Los pacientes con síntomas semejantes a la colitis ulcerosa pueden desarrollar anemia por deficiencia de hierro. En algunos casos puede llegar a ser necesaria la resección de parte del intestino (Kern et al, 2007).

Los estrechamientos uretrales también pueden requerir de intervención quirúrgica (Lai-Cheong et al, 2010).

En las mujeres embarazada con SK, la cesárea podría ser el método de elección si hay estenosis vaginal (Hayashi et al, 2007)

2.5. Terapia Génica

El SK al igual que el resto de las EB, no tiene un tratamiento curativo. Sin embargo la terapia génica, un procedimiento que implica la inserción de los genes funcionales ausentes o alterados en el genoma de un individuo, ya está beneficiando a algunos pacientes de EB (Hirsch et al, 2017).

Para diseñar una terapia génica adecuada es necesario conocer primero los genes mutados, las consecuencias específicas de dichas mutaciones y la naturaleza del gen y la proteína afectada (Uitto y Pulkkinen, 2000). Se ha de controlar además la expresión del gen modificado y la expresión tejido-específica para obtener los mejores resultados.

La accesibilidad de la piel y el progreso realizado en los últimos años en el conocimiento de las bases genéticas de muchas genodermatosis, las convierte en candidatas para este tratamiento.

La terapia génica cutánea puede ser utilizada *in vivo* o *ex vivo* (Uitto y Pulkkinen, 2000). *In vivo* el material genético es introducido directamente en la piel mediante inyección, electroporación o “pistola génica”. *Ex vivo* se toma una muestra del paciente, se cultivan las células y se introduce en ellas material genético. Posteriormente se realiza un injerto con el equivalente de piel modificado.

2.6. Modelo Animal

La piel es un tejido accesible y en constante renovación, lo que facilita el estudio de sus enfermedades y el ensayo de estrategias terapéuticas. Para ello, es importante disponer de un modelo experimental de la piel en un contexto “humanizado” (Carretero et al, 2011).

El estudio experimental de las enfermedades de la piel y de sus posibles terapias se ha abordado utilizando diversas fuentes:

- Voluntarios y pacientes: No es viable por inconvenientes de tipo ético y práctico.
- Modelo animal: No reproduce fielmente las patologías cutáneas humanas.
- Cultivos *in vitro* de equivalentes de piel humana: La vida media de estos cultivos es corta y no se pueden reproducir las repuestas *in vivo* como la angiogénesis.
- Trasplantes Xenogénicos: Se trata del injerto de biopsias cutáneas humanas en ratones inmunodeficientes (IMD). Sus principales inconvenientes son la dificultad para conseguir el gran número de muestras necesarias y la heterogeneidad de los factores genéticos y ambientales de las muestras que pueden alterar los resultados.
- Injerto de equivalentes cutáneos humanos en ratones IMD.

En la Unidad de Medicina Regenerativa del CIEMAT se ha desarrollado un modelo de ratón “humanizado”, a través del injerto permanente de piel humana bioingenierizada en la espalda de ratones inmunodeficientes (Del Río M et al, 2002; Llames et al, 2004).

Utilizando una sola muestra de piel de un donante, se pueden conseguir un gran número de ratones portadores de injertos de piel genéticamente homogéneos (figura 33). Esta piel trasplantada mantiene las características estructurales y funcionales de la piel de origen (Del Río M et al, 2002). Los injertos permanecen viables durante toda la vida del animal debido a la presencia de células madre epidérmicas en la piel humana regenerada.

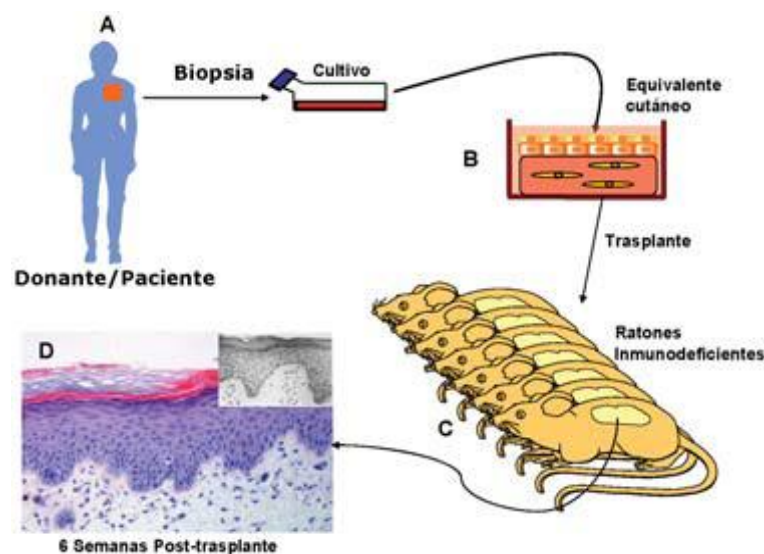


Figura 33. Modelo de ratón “humanizado” desarrollado en la Unidad de Medicina Regenerativa del CIEMAT.

Este modelo también permite la posibilidad de usar queratinocitos y/o fibroblastos humanos manipulados genéticamente *in vitro* para sobreexpresar o silenciar genes específicos, generando modelos de piel humanizada transgénica o knockout, respectivamente (Carretero et al, 2011).

A nivel preclínico, el modelo de ratón humanizado creado en el grupo de medicina regenerativa del CIEMAT está siendo utilizado en el estudio de curación de heridas (Escamez et al, 2004), en el estudio de enfermedades inflamatorias de la piel (Guerrero-Aspizua et al, 2010), en el de enfermedades con predisposición al desarrollo de cáncer (Garcia et al, 2010) y en el de algunas EB (Gache et al, 2004).

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El SK es una genodermatosis rara (250 casos informados), y por ello poco conocida entre la población en general y entre el personal sanitario en particular, por lo que su estudio y divulgación puede repercutir favorablemente en los pacientes de diversas maneras.

El SK presenta una gran variabilidad clínica, que abarca desde pacientes adultos con mínima afectación de la piel hasta pacientes jóvenes con una extensa afectación de las mucosas y fibrosis a varios niveles. Hasta la fecha se han identificado 75 variantes patogénicas del gen FERMT1 asociadas a SK, la mayor parte nulas, es decir con una pérdida completa de la función de la proteína y algunas (missense y “in-frame deletion”) que podrían dar lugar a un fenotipo leve. Además se cree que existen una serie de factores medioambientales y factores modificadores que pueden variar el curso de la enfermedad (Has et al, 2010 y 2011).

En esta tesis se recopilan un total de 15 pacientes de SK. En 7 de ellos la información clínica y los estudios han sido recopilados y/o realizados en la Unidad de Medicina Regenerativa del CIEMAT, desde el año 2005 hasta el presente. Los 8 pacientes restantes han sido proporcionados por el Dr. Penagos y pertenecen a la tribu Panameña Ngöbe-Buglé, que reúne el mayor número de pacientes de SK del mundo.

El análisis de las características clínicas y genéticas de estos pacientes, confrontado a lo publicado hasta hoy sobre SK puede mejorar la correlación genotipo-fenotipo de la enfermedad y ayudar en la comprensión de sus factores modificadores.

Por último, para mejorar el conocimiento de los mecanismos moleculares de la enfermedad, de la relación genotipo-fenotipo, de los factores modificadores y para el ensayo de nuevas terapias, es necesario disponer de un modelo preclínico que recapitule in vivo las características de la enfermedad.

En este trabajo, en base a modelos anteriores realizados en la Unidad de Medicina Regenerativa del CIEMAT, se ha llevado a cabo un modelo de ratón humanizado de SK, que ha de recapitular las características patológicas de origen.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Por todo ello, los objetivos de esta tesis son:

1. Valorar las características clínicas, histopatológicas y genéticas de los pacientes incluidos en el estudio.
2. Efectuar una revisión exhaustiva de la literatura científica para recopilar las características fenotípicas en las distintas mutaciones de FERMT1.
3. Comparar los resultados de esta búsqueda con los datos obtenidos en nuestra población de estudio, con el fin de colaborar al conocimiento de la correlación fenotipo-genotipo en el SK.
4. El desarrollo de un modelo de ratón humanizado que recapitule las características de la enfermedad, de manera que pueda conducir a un mayor entendimiento de la función de FERMT1 en la epidermis y al ensayo de tratamientos curativos para los pacientes SK.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Pacientes

Desde el año 2017 la Unidad de Medicina Regenerativa del CIEMAT es el centro de referencia para el diagnóstico de EB en España, junto al Hospital Universitario La Paz y el Hospital Sant Joan de Déu. Entre los años 2005 y 2019 en dicha Unidad se han recopilado 320 casos de EB, 8 de los cuales corresponden a SK. En esta tesis evaluamos a 7 de estos sujetos (pacientes 1 a 7), de los que disponemos de consentimiento informado, historia clínica, fotografías, diagnóstico histopatológico y genético.

Adicionalmente se incluyen 8 individuos (pacientes 8 a 15), pertenecientes a la tribu Panameña Ngöbe-Buglé, con sospecha clínica de SK, cuyo material documental y biológico ha sido proporcionado por el Dr. Penagos, dermatólogo de la Caja de Seguro Social, Universidad Autónoma de Chiriquí (Panamá), para su diagnóstico genético.

4.2. Muestras

Se obtuvieron muestras de piel y sangre de todos los pacientes implicados en el estudio, para la realización del análisis molecular y genético. Parte de las biopsias fue utilizada para el mapeo antigénico y el análisis histológico y otra parte se utilizó para el aislamiento de fibroblastos y queratinocitos, que fueron usados para generar equivalentes dermo-epidérmicos.

Respecto a los pacientes panameños, el Dr. Penagos nos proporcionó biopsias de piel y ADN para el diagnóstico histopatológico y genético.

4.3. Análisis Histológico y de Inmunofluorescencia.

Para el análisis histológico con microscopio de luz convencional, una parte de cada biopsia de piel se fijó en formol, luego se embebió en parafina, se hicieron secciones con el microtomo y finalmente se tiñeron con hematoxilina-eosina.

De la parte restante se realizaron cortes por congelación para ser usadas en el mapeo antigénico mediante inmunofluorescencia indirecta. Las muestras se cubrieron de OCT (Tissue-Tek) y con un microtomo criostático se hicieron cortes seriados de 5 μm que se montaron sobre portaobjetos de cristal y se fijaron una hora a temperatura ambiente.

El mapeo se realizó mediante inmunofluorescencia indirecta contra distintas proteínas de interés de la piel de los pacientes (colágeno IV, colágeno VII, laminina-332 e integrinas $\beta 1$, $\beta 4$ y $\alpha 6$) (tabla 2). Para ello las muestras se bloquearon con PBS/BSA 3% durante 45 minutos y posteriormente se incubaron una hora con el anticuerpo primario, una inmunoglobulina IgG dirigida contra la proteína humana buscada. Luego se incubaron otra hora con un anticuerpo secundario específico unido a FITC (fluorescein isothiocyanate), que al unirse al anticuerpo primario revela la presencia o ausencia de la proteína. Los lavados intermedios se hicieron con PBS 1x. Los anticuerpos se diluyeron con PBS 1x/BSA 3%.

Finalmente cada porta se cubrió con un cubreobjeto al que se añadió moviol (Hoechst) y DAPI (1 ml de moviol y 10 μl de DAPI). DAPI es un complemento para la detección de ácidos nucleicos ya que tiñe los núcleos de azul. Por último, la muestra se observó en un microscopio de fluorescencia Zeiss.

Tabla 2. Relación de los anticuerpos primarios y secundarios empleados en la inmunofluorescencia indirecta en pacientes.

Anticuerpos Primarios	Anticuerpos Secundarios
Anticuerpo monoclonal IgG, contra colágeno IV humano, producido en ratón. Dako. Dilución 1:30.	Anticuerpo contra Ig G de ratón, marcado con FITC. Producido en burro. Jackson. Dilución 1:50.
Anticuerpo monoclonal IgG, contra colágeno VII humano, producido en ratón. Sigma. Dilución 1:100.	
Anticuerpo monoclonal IgG, contra integrina humana $\beta 1$, producido en ratón. BAbCO. Dilución 1:1000.	
Anticuerpo monoclonal IgG, contra integrina humana $\beta 4$, producido en ratón. GIBcoBRL. Dilución 1:200.	
Anticuerpo monoclonal IgG, contra laminina-332 humana, producido en ratón. Cortesía de la Dra. Zambruno. Dilución 1:10.	
Anticuerpo monoclonal IgG, contra integrina $\alpha 6$ humana, producido en rata. abcam. Dilución 1:100.	Anticuerpo contra Ig G de rata, marcado con FITC. Producido en burro. Jackson. Dilución 1:50.

4.4. Procesamiento de las biopsias de piel para el aislamiento y cultivo celular.

Fragmentación y digestión de las muestras

El tratamiento de las muestras de piel de los pacientes incluye un proceso de digestión enzimática ya descrito con anterioridad (Rheinwald y Green, 1975; Meana et al 1998).

MATERIAL Y MÉTODOS

El proceso comienza con la disgregación mecánica de las muestras, evitando la separación de dermis y epidermis. Los fragmentos se incuban en una solución de tripsina 0.05%-EDTA 0.02% (Sigma), agitada constantemente a 37°C en ciclos de 30 minutos. Tras cada uno de los ciclos, la solución se repone y la que se retira, se inactiva con DMEM (*Dulbecco's modified Eagle Medium*), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, Gibco-BRL) y se centrifuga a 1400 rpm durante 10 minutos. El sedimento celular obtenido, se resuspende en un medio de siembra de queratinocitos. Los ciclos se repiten hasta que no se obtienen más células de la muestra.

El medio de siembra de queratinocitos es una mezcla en proporción 3:1 de DMEM-Glutamax™ y HAM-F12-Glutamax™ (*Nutrient mixture HAM*, Gibco-BRL), suplementado con 10% de suero Highclone, 1% de antibióticos (penicilina, estreptomicina), toxina colérica (8 ng/ml, Sigma), insulina (5 µg/ml, Sigma), adenina (24 µg/ml, Sigma), hidrocortisona (0.4 µg/ml, Sigma) y tirosina triyodada (1.3 ng/ml, Sigma).

Para evitar la contaminación con micoplasmas, que impedirían el crecimiento celular, todos los medios que van a entrar en contacto con los queratinocitos se pasan por un filtro (Milipore express plus 0,10 µm).

Los fragmentos de biopsia no digeridos se incuban con colagenasa tipo I (Sigma), diluida al 0,2% en medio DMEM-Glutamax™ con antibióticos (penicilina, estreptomicina). Esta mezcla se mantiene en agitación constante a 37°C durante 3 horas para digerir la matriz extracelular y aislar los fibroblastos. Posteriormente se centrifuga a 1400 rpm durante 10 minutos y el sedimento celular resultante se resuspende en medio de cultivo de fibroblastos, consistente en DMEM-Glutamax™ suplementado con 10% de suero fetal bovino y antibióticos (penicilina, estreptomicina y primocin).

Cultivo primario de queratinocitos

Los queratinocitos aislados se siembran en frascos de 75 ml (Beckton-Dickinson), con una densidad de $2,5 \times 10^4$ células/cm², sobre una capa de fibroblastos de ratón 3T3-J2. Estos fibroblastos se irradian sub-letalmente con rayos X, a una dosis de 50 Gy, de forma que no pueden entrar en mitosis pero sí son un eficaz soporte mecánico y metabólico para los queratinocitos. Esta capa, también llamada feeder layer, se obtiene sembrando los fibroblastos irradiados, 24 horas antes del cultivo primario de los queratinocitos (1×10^5 células/cm²). Este paso es necesario para que las células, que se preservan congeladas en alícuotas, adopten la morfología fibroblastoide.

Para asegurar la adhesión celular, los queratinocitos se mantienen durante dos días en su medio de siembra y posteriormente se amplifican en el medio de crecimiento. Ambos medios solo se diferencian en que el segundo se suplementa con 10 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (EGF; Invitrogen Life Technologies).

Los cultivos se mantienen en un incubador, a 37°C en una atmósfera saturada de humedad y con un 5% de CO₂. Una vez que las células alcanzan un 80-90% de confluencia, se lavan con PBS estéril y se tratan durante 5 minutos con una solución de PBS-EDTA 0,5 mM, que elimina completamente la capa de fibroblastos irradiados. Finalmente las células se separan de la superficie de crecimiento mediante una solución de tripsina y se centrifuga. Los queratinocitos obtenidos se criopreservan en nitrógeno líquido, resuspendidos en suero fetal bovino con un 10% de DMSO (Merck) o se amplifican.

Cultivo primario de fibroblastos

Los fibroblastos aislados se siembran con una densidad de 1×10^5 células/cm² en el medio de crecimiento de fibroblastos, manteniéndose a 37°C en una atmósfera saturada de humedad y con un 5% de CO₂. El medio se cambia cada 72 horas. Cuando se incrementa significativamente el número de fibroblastos, se liberan mediante tripsina, para ser sembrados nuevamente o para ser criopreservados.

4.5. Estudio genético

El estudio de los pacientes 1, 2, 3 y 4 fue realizado en el laboratorio de la Dra. Zambruno en el Instituto Dermatológico de la Inmaculada, Roma.

El diagnóstico genético de los pacientes 5, 6 y 7 se realizó en la Unidad de Medicina Regenerativa del CIEMAT, a partir de ADN extraído de linfocitos de sangre periférica, empleando el kit QIAamp DNA Blood Maxi Quid (Qiagen, Venlo, The Netherlands)

Para el análisis genético se amplificó, mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la región codificante completa (15 exones) y las zonas de intrón limítrofes, del gen FERMT1. Los primers usados son los descritos por Siegel (Siegel et al, 2003) (tabla 3).

Tabla 3. Primers utilizados en el diagnóstico genético.

Primer	Secuencia	Tªde annealing (°C)	Tamaño del producto (pb)
1F	AAATCTGCAGACTGCGCCTC	60	473
1R	GAGGCTGCAGAAAGAAAGGG	60	473
2F	ATATCTGGAGCACCTGGAAC	58	401
2R	ATTGCTCTCCAGGGCATTAC	58	401
3F	TGAGGAGCTGGAGATCAGTT	58	416
3R	GAAGTAGGCAGAATGCACAC	58	416
4F	GACCCTGAGTCTTAGAAGGA	58	343
4R	GCCTTTCCTCATCACATCAG	58	343
5F	CAGTGCCCAGCTTGACTTAT	58	455
5R	ATCCCTAGGCCTACCAACTT	58	455
6F	CAGTGCTCAGAAAGTGTCAG	58	407
6R	GCTAAACAGGCGATCACACA	58	407
7F	CTGAGCTGAAGTTTGCTGCA	58	434
7R	GTGTGTGGATTATGAGGAGC	58	434
8F	AAGGAGACCTCTGTTTAGGA	56	404
8R	CTTGTTAGGTGAAGAGCATC	56	404
9F	GTAGCGAGTGTAAGTGAAG	56	315
9R	ACCTTTGAACCATGAACCTG	56	315
10F	TGCAGCGTGTTCCACATTTT	58	257
10R	GGATTACAGGTTTGAGCCAC	58	257
11F	ACAGATGCCTCAGAACTCAG	58	208
11R	TGCTCTTAGGCTTAGTGAG	58	208
12F	GCTTTGCACTTGAGCTTGCT	58	375
12R	GTGCTGGAATTACAGGTGTG	58	375
13F	CTAACAGGGTGATCACAGAG	56	269
13R	CTAAATGAGAAACTGGGGCT	56	269
14F	CTTCATTGTCCATTCCTCTG	58	328
14R	CAATTCTGAGGGACACACAT	58	328
15F	CCAGTCCAGCAAAGCACTTT	58	343
15R	GTCCAGAATCTACATGCTGG	58	343

MATERIAL Y MÉTODOS

En el paciente 7, tras realizar el protocolo habitual, se procedió a la amplificación del cDNA entre los exones 9 y 14, para lo cual se emplearon los siguientes primers:

- Left primer: CGGACAGCCTTTTGGAGGAC
- Right primer: TCAACCTGTTATATGAAACTCCCAGAA

En todos los casos, con una sola PCR “touchdown”, es decir, un proceso de PCR en el que un gradiente de temperaturas melting se repite hasta 36 veces, se logra la amplificación de las zonas de interés

La mezcla para cada PCR se compone de:

Agua	39 µl
Buffer 10x	5 µl
MgCl ₂	1,5 µl
dNTPs 10 mM	1 µl
Taq polimerasa	0,5 µl
Cebador Forward 25mM	1 µl
Cebador Reward 25 mM	1 µl
DNA del paciente	1 µl

El *buffer*, MgCl₂, dNTPs y la *Taq polimerasa* empleadas, son de la marca invitrogen.

Mediante electroforesis en gel de agarosa (Agarose D-1 Low EEO, CONDA) al 1,5%, con TB 1X y 5 µl de Bromuro de Etidio, se comprobó la amplificación de cada exón. Se usó como referencia el marcador IX (figura 34).

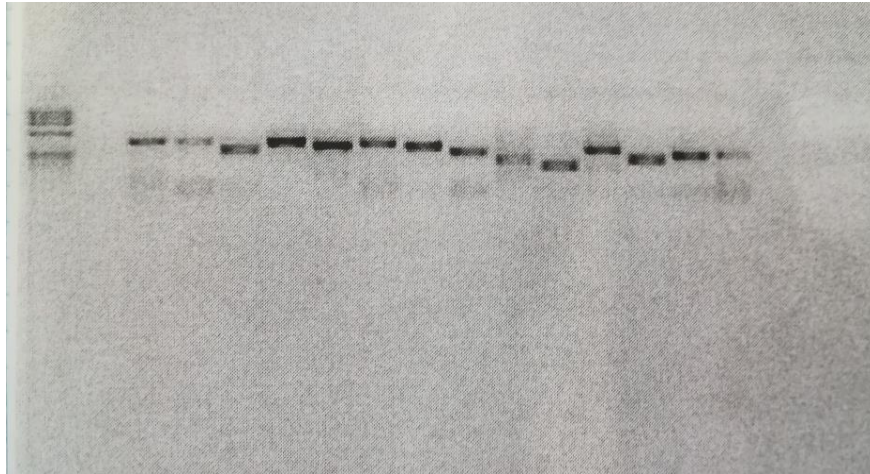


Figura 34. Electroforesis en gel de agarosa de uno de los pacientes del estudio. La primera columna corresponde al marcador IX y el resto a cada uno de los 15 exones de FERMT1.

Los exones amplificados se purificaron con el kit GFX PCR DNA de GE Healthcare. En la preparación de los exones para la secuenciación, se usó una mezcla de 6 μ l de cada exon amplificado y 2 μ l del cebador *Forward* en un pocillo y del cebador *Reward* en otro, repitiendo la operación con cada exon. La secuenciación se realizó en la Facultad de Biología de la Universidad Complutense en un secuenciador ABI PRISM 3730 DNA.

Las secuencias de ADN resultantes se compararon mediante el programa *Chromaspro* con las secuencias de referencia del ADN genómico del gen FERMT1 tomadas de la página www.ensembl.org (ENSG00000101311), para poder demostrar o descartar la existencia de cualquier alteración genética que pueda producir o no patología.

4.6. Preparación de los equivalentes dermo-epidérmicos humanos

Se basa en el uso de una matriz dérmica, rica en fibrina, en la que se embeben los fibroblastos. Una vez generada la matriz, se siembran los queratinocitos, aislados y cultivados a partir de las biopsias de la piel de los pacientes (Meana et al, 1998; Del Río M et al, 2002; Llames et al 2004) (figura 35).

MATERIAL Y MÉTODOS

Como componente dérmico se emplea una matriz de fibrina en la que se incluyen los fibroblastos previamente cultivados. Para ello se resuspenden 5×10^5 fibroblastos, en 12 ml de DMEM, con 10% de SFB y 500 UI de aprotinina bovina (Trasylol, Bayer). A continuación se añaden 3 ml de fibrinógeno procedente de plasma sanguíneo, 1 ml de CaCl_2 a una concentración de 0,025 mM (Sigma) y 11 UI de trombina bovina (Sigma) para iniciar la coagulación.

La mezcla se distribuye homogéneamente por la superficie de una placa multipocillos (Costar™, Corning incorporated) y se mantiene en un incubador de CO_2 a 37°C , hasta su coagulación (30-45 min), momento en el que se siembran los queratinocitos, resuspendidos en su medio de crecimiento.

El crecimiento de los queratinocitos se sigue mediante un microscopio invertido. Cuando confluyen, el equivalente dermo-epidérmico está listo para ser trasplantado.

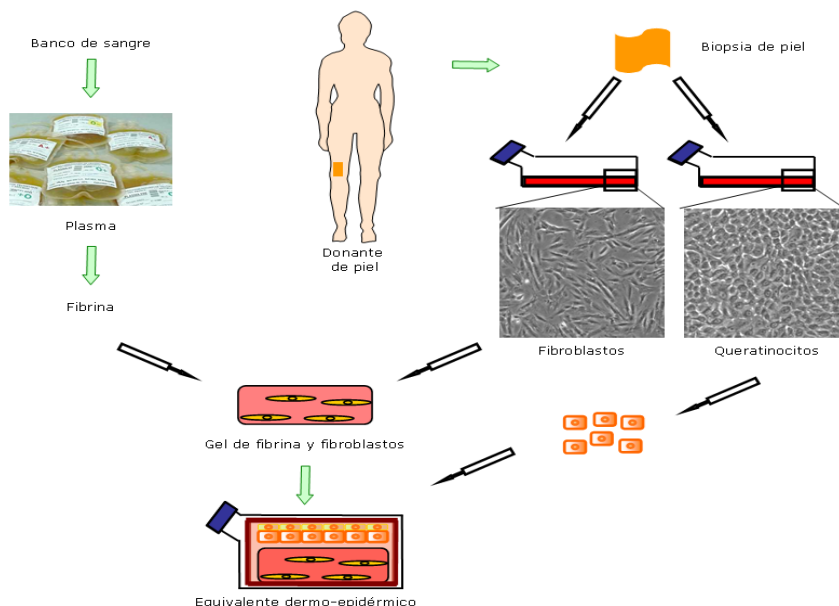


Figura 35. Generación de equivalentes dermo-epidérmicos humanos. Los fibroblastos cultivados se embeben en una matriz rica en fibrina. Se genera una dermis artificial en la que los fibroblastos se disponen tridimensionalmente y sobre la que se siembran los queratinocitos que constituyen el componente epidérmico.

4.7. Generación del modelo de ratón humanizado

4.7.1. Animales de experimentación

Para generar el modelo se emplearon ratones atímicos NMRI-Foxn1^{nu}/Foxn1^{nu} RjOrl de 6 semanas de edad (Janvier LABS, Le Genest Saint Isle). Son ratones albinos, sin pelo y sin timo, por lo que prácticamente no tienen células T pero sí un aumento compensatorio de los niveles de células NK (natural Killer) (Pantelouris, 1968).

Los animales se mantienen estabulados en el animalario del CIEMAT, en jaulas de tipo II, ventiladas individualmente (máximo 5 animales por jaula), con todos los materiales tratados térmicamente y manejados en cabinas de flujo laminar clase II. Las jaulas se encuentran en una sala con condiciones de esterilidad.

Todos los procesos experimentales se llevaron a cabo de acuerdo con la legislación europea y española vigente en el momento de su realización (Ley 32/2007 para el cuidado de animales; Real Decreto: 1201/2005 del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, y Convenio ETS 123 del Consejo de Europa sobre el uso y protección de animales vertebrados utilizados para experimentación y otros propósitos científicos).

Los procedimientos fueron aprobados por el OH-OEBA (Órgano Encargado del Bienestar Animal, Órgano Habilitado designado por la Comunidad de Madrid, Resolución 10/085231.9/14 del Director General de Medio Ambiente de la Comunidad de Madrid de fecha 19/3/2014).

4.7.2. Trasplante del equivalente

El procedimiento se inicia anestesiando a los animales con una combinación de medetomidina (0.8 µg/gr de peso; Domtor®, Pfizer) y ketamina (0.1 mg/gr de peso; Ketolar®, Pfizer), administradas por vía intraperitoneal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Es un protocolo de anestesia seguro y eficaz, reversible con una inyección de atipamezol (2 µg/gr de peso; Antisedan[®], Pfizer)

Bajo anestesia y tras desinfectar la zona a trasplantar, se realiza una herida circular en el lomo del animal, por debajo de la inserción del folículo piloso y por encima de la fascia muscular, del mismo tamaño que el equivalente cutáneo a trasplantar (unos 12 mm de diámetro). La piel retirada se desvitaliza, sometiéndola a tres ciclos de congelación en nitrógeno líquido, alternados con 3 ciclos de descongelación por calentamiento en un baño a 37°C. El equivalente dermo-epidérmico humano se coloca en la zona preparada y se cubre con la piel desvitalizada del ratón, que se cose a los bordes de la herida mediante sutura no absorbible estéril (MERSILK[®] Seda Trenzada 5-0. Ethicon Inc). La piel desvitalizada, que se desprende de forma natural en torno a las 6-8 semanas, actúa como un vendaje biológico que protege y cubre el equivalente cutáneo durante el proceso de toma (figura 36).

Doce semanas después del trasplante, la piel humana regenerada en la espalda de los ratones, ha finalizado su diferenciación y recapitula las principales características clínicas e histológicas de la piel humana madura, tanto a nivel dérmico como epidérmico. A este animal de experimentación, portador de piel humana, se le denomina “ratón humanizado en piel”.

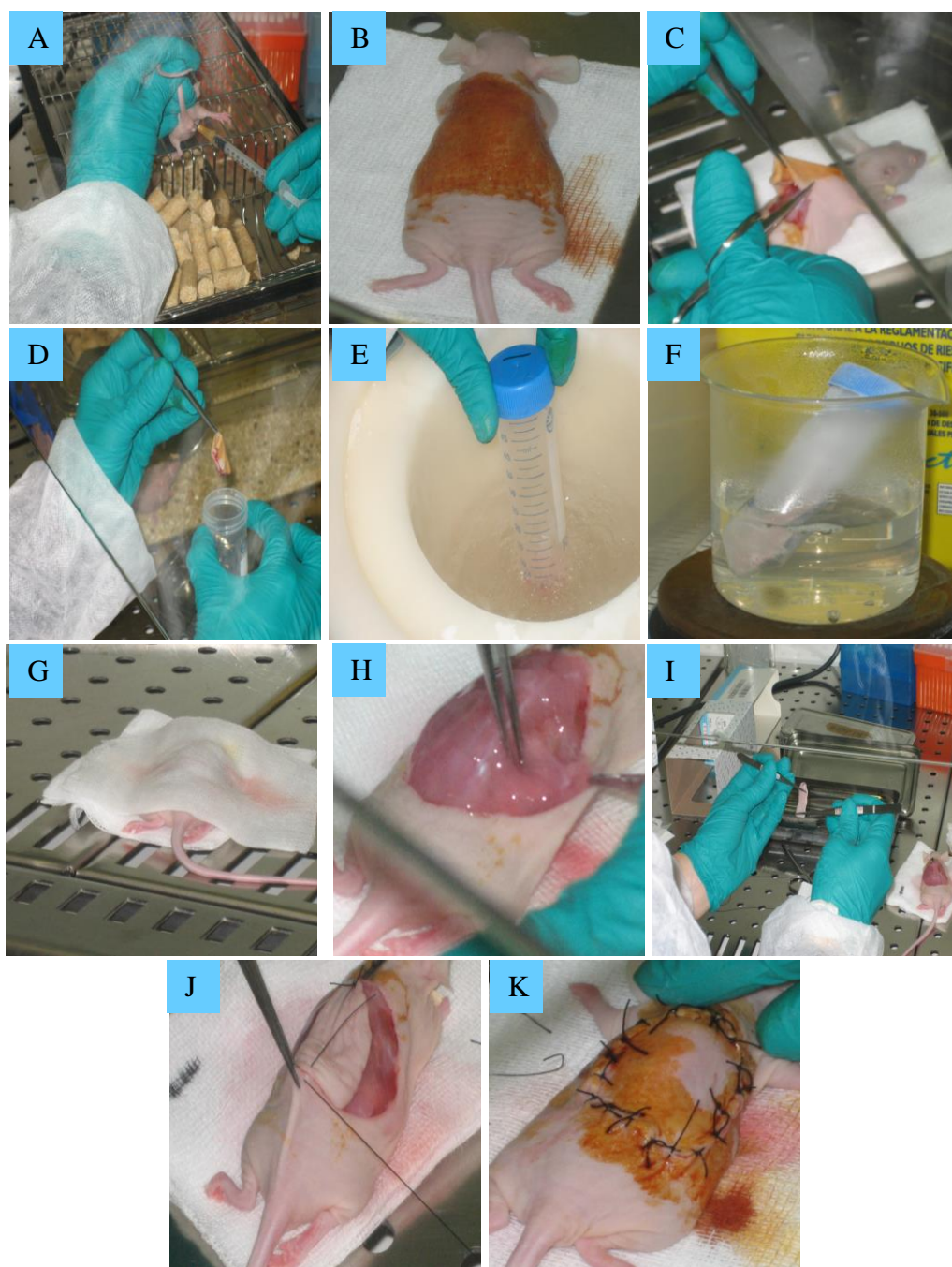


Figura 36. Trasplante de equivalentes dermo-epidérmicos a ratones desnudos. Una vez que el ratón ha sido anestesiado, se procede a retirar del lomo un área circular de piel (A-C). La piel del ratón se desvitaliza mediante varios ciclos de congelación/descongelación en nitrógeno líquido (D-F). El equivalente dermo-epidérmico se trasplanta a la herida producida en el lomo del ratón y se cubre con la piel desvitalizada, cosiéndola al borde de la herida, con el fin de que proteja el trasplante como si fuera un apósito (G-K).

4.7.3. Verificación del modelo

Una vez finalizado el modelo de ratón y para confirmar que se trata de piel humana y que reproduce el fenotipo característico del SK, se tomó una biopsia punch de 2mm y se realizó inmunofluorescencia indirecta contra involucrina, loricrina, colágeno VII, colágeno IV, colágeno VII y laminina-1 (tabla 4).

Tabla 4. Anticuerpos primarios y secundarios adicionales, utilizados para inmunofluorescencia indirecta en las muestras de trasplante.

Anticuerpos Primarios	Anticuerpos Secundarios
Anticuerpo monoclonal contra laminina-1 humana y de ratón, producido en conejo. Sigma. Dilución 1:60	Anticuerpo contra Ig G de conejo, marcado con FITC. Producido en burro. Jackson. Dilución 1:50
Anticuerpo policlonal contra loricrina humana y de ratón, producido en conejo. Covance. Dilución 1:200	
Anticuerpo monoclonal contra involucrina humana producido en ratón. Sigma. Dilución 1:100.	Anticuerpo contra Ig G de ratón, marcado con FITC. Producido en burro. Jackson. Dilución 1:50

5.1. Estudio clínico

Paciente 1

Mujer de 29 años, cuyos padres son primos lejanos, sin antecedentes familiares de enfermedades ampollosas. Tiene una hermana no afecta. La enfermedad debutó en el periodo neonatal con algunas ampollas en los pies y en la infancia presentó erosiones bucales y caries (figura 37).



Figura 37. Paciente 1. En la actualidad la paciente muestra escasas erosiones, atrofia cutánea en dorso de manos y pies y una marcada poiquilodermia (hipo/hiperpigmentación, atrofia y telangiectasias).

Paciente 2

Mujer de 42 años, sin antecedentes de consanguineidad y con una hermana afecta (paciente 3). Las ampollas comenzaron en el periodo neonatal, en pies y boca. En la actualidad muestra erosiones bucales, atrofia cutánea y poiquilodermia en las extremidades inferiores (figura 38).

La paciente fue diagnosticada de SK antes del primer año de vida mediante una biopsia tomada de la boca.



Figura 38. Paciente 2. Muestra microstomía, erosiones bucales y defectos en el esmalte dental. Se observa además poiquilodermia en extremidades inferiores y pérdida de la uña pequeña de los pies.

En el periodo neonatal presentó estenosis pilórica y ya en la edad adulta tiene estenosis esofágica con disfagia, reflujo gastrointestinal, estreñimiento y fisura anal.

Antes de los 6 meses precisó transfusiones, antes de los 16 años se sometió a un injerto alodérmico para separar el labio de la encía y a los 26 años requirió tratamiento para la estenosis esofágica.

Paciente 3

Mujer de 39 años, hermana de la paciente 2. En los primeros meses de vida pesentó ampollas en las manos y la boca. Actualmente persisten las lesiones bucales y presenta poiquilodermia en la cara anterior de cuello.

Al igual que la paciente 2 muestra la pérdida de la uña del dedo pequeño de los pies y sufre microstomía, erosiones bucales y disfagia, éstas últimas unicamente tras la toma de comidas picantes. Además tiene gingivitis.

A nivel ocular la paciente muestra ampollas/erosiones conjuntivales, posibles cicatrices corneales y dolor ocular.

En cuanto a su estado general refiere astenia y prurito con los cambios de temperatura.

No se dispone de fotografías de esta paciente

Paciente 4

Mujer de 15 años, sin datos de consanguineidad ni antecedentes familiares de enfermedades ampollosas. La enfermedad comenzó en el periodo neonatal con ampollas que curaban dejando cicatriz y milia (figura 39).

Hasta los 6 años presentaba defectos en el esmalte dental, estreñimiento y fisura anal. No disponemos de información adicional sobre su estado actual.



Figura 39. Paciente 4. Imágenes a la edad de 6 meses (imágenes superiores) y 2 años (imágenes inferiores). Vemos la presencia de ampollas ya evolucionadas y de milia en los antebrazos.

Paciente 5

Mujer de 23 años sin datos de consanguineidad ni antecedentes familiares de interés.

La enfermedad debutó a los 15 días de vida con diarrea sanguinolenta. La paciente requirió inicialmente largas temporadas de hospitalización, corticoides orales y alimentación parenteral. Posteriormente presentó una estenosis esofágica que condicionó hasta los 5 años una dieta líquida y semisólida y más adelante dilataciones esofágicas cada 3 o 4 años.

Al año de vida aparecieron ampollas generalizadas y xerosis. Actualmente presenta atrofia cutánea en el dorso de las manos, poiquilodermia en cara, cuello y escote (figura 40).



Figura 40. Paciente 5. La paciente presenta en el dorso de las manos piel fina y atrófica en “papel de fumar” y lesiones pigmentadas en antebrazos.

A nivel bucal muestra además aftas bucales dolorosas permanentes, sobre todo en mucosa yugal, periodontitis por la que requiere higienización dental cada 15 días y halitosis. La paciente sufre tránsito intestinal lento y estreñimiento por úlceras en intestino grueso, fibrosis del recto y estenosis anal. Presenta también estenosis vaginal, de la que ha sido intervenida en dos ocasiones y liquen escleroso y atrófico vulvar. Además presentó una lesión sospechosa de carcinoma escamoso en el párpado inferior izquierdo de la que no se tiene confirmación histológica.

Paciente 6

Mujer de 51 años de edad, sin datos de consanguineidad ni antecedentes personales ni familiares de interés.

En la infancia desarrolló lesiones ampollosas acrales y fragilidad cutánea, con aparición progresiva de poikilodermia cutánea, sin fotosensibilidad.

La paciente presenta poikilodermia generalizada, más marcada en cuello, axilas, ingles y extremidades, fragilidad cutánea acral, manos de aspecto esclerodermiforme con discreta hiperqueratosis palmar y tendencia a la flexión ventral, pérdida de los dermatoglifos (dibujos cutáneos en las yemas de los dedos) y flexión permanente del quinto dedo de las manos. Presenta hipercurvatura ungueal y pérdida de uñas de manos y pies.

La paciente refiere algunas dificultades en la deglución, caries y pérdida de piezas dentales a partir de los 20 años. Actualmente se objetiva la presencia de queilitis angular, erosiones en la mucosa yugal y placas blanquecinas linguales (leucoqueratosis). La paciente refiere además xeroftalmia (sequedad ocular) (figura 41).

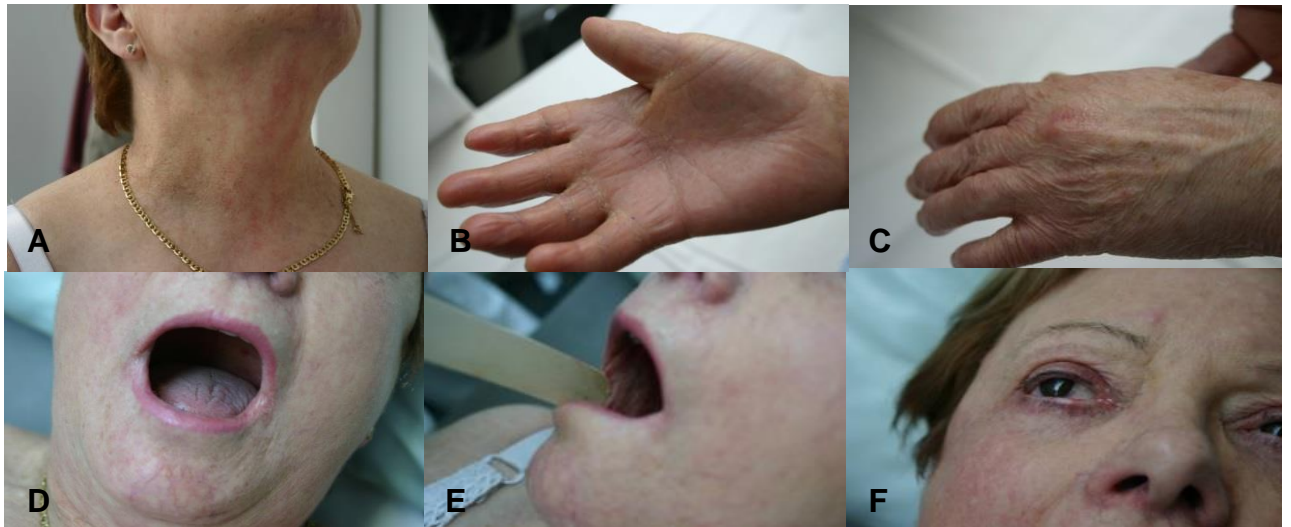


Figura 41. Paciente 6. **A.** Poiquilodermia en cuello. **B y C.** Manos de aspecto esclerodermiforme con discreta hiperqueratosis palmar, tendencia a la flexión ventral, pérdida de los dermatoglifos (dibujos cutáneos en las yemas de los dedos) y flexión permanente del quinto dedo de las manos. **D y E.** Queilitis angular, erosiones en la mucosa yugal y placas blanquecinas linguales (leucoqueratosis). **F.** La paciente refiere xeroftalmia.

Paciente 7

Mujer de 7 años, cuyos padres son familiares lejanos, sin otros miembros afectados por enfermedades ampollas.

La paciente fue diagnosticada en el primer mes de vida de SK tras presentar ampollas hemorrágicas espontáneas. Ha tenido estreñimiento y fisura anal por piel frágil.

En la actualidad presenta lesiones ampollosas hemorrágicas aisladas en los dedos de la mano izquierda y lesiones en resolución en manos y rodilla derecha. La piel muestra un aspecto atrófico en el dorso de las manos, antebrazos, pies y pantorrillas (figura 42).

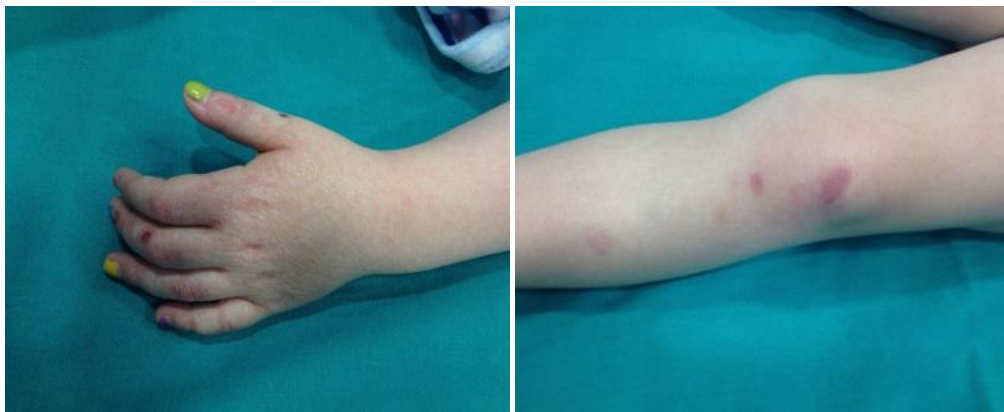


Figura 42. Paciente 7. Lesiones ampollosas en curación y atrofia cutánea.

Paciente 8

Varón panameño en edad infantil (figura 43), familiar de los pacientes 9 (hermano) y 12 (hijo).



Figura 43. Paciente 8. En las imágenes disponibles se observa hipo/hiperpigmentación generalizada, ampollas/erosiones en curación y atrofia cutánea en el dorso de los pies.

Paciente 9

Mujer panameña de 6 años (figuras 44 y 45), hermana del paciente 8.



Figura 44. Paciente 9. En la cara se aprecian máculas/manchas hipopigmentadas sobre la piel hiperpigmentada, una lesión melánica y erosiones en la proximidad al labio inferior y sobre él. En el dorso de la nariz se pueden ver varias lesiones blanquecinas de apariencia elevada y engrosada que podrían corresponder a cicatrices. En los incisivos superiores se observa un defecto en el esmalte dental del tipo amelogénesis imperfecta (manchas blancas y amarillentas) con caries en la superficie plana de los dientes.



Figura 45. Paciente 9. La hipo e hiperpigmentación también están presentes en el cuello, tórax y en las extremidades, acompañándose en éstas de atrofia cutánea, especialmente en el dorso de las manos.

Paciente 10

Varón panameño de 19 años de edad. La atrofia cutánea no es valorable en las fotografías de manos y piernas, pero en el resto de la piel parece existir un cierto grado de fragilidad cutánea (figuras 46 y 47).



Figura 46. Paciente 10. La piel de la cara ofrece un aspecto moteado por la presencia de discromía. En la cavidad oral, la encía alrededor de los incisivos superiores se ve enrojecida, signo de una gingivitis en fase inicial, todavía reversible. Además se aprecia la pérdida de las piezas dentales próximas. En los dedos de la mano parece observarse una pérdida de los dermatoglifos.

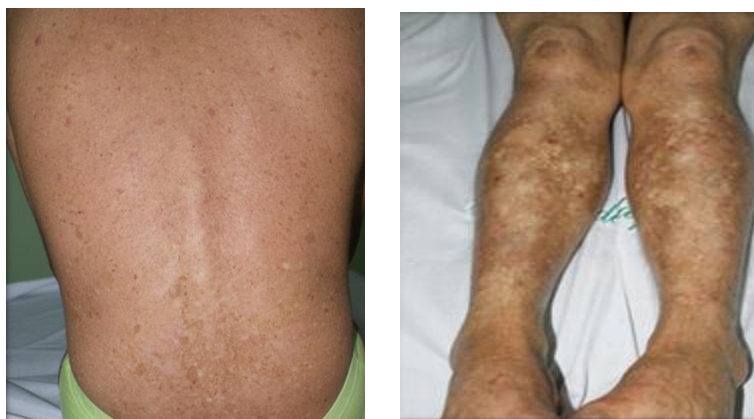


Figura 47. Paciente 10. La poikilodermia es mucho más marcada en las extremidades, con alternancia de grandes zonas hipo e hiperpigmentadas y atrofia cutánea. En las piernas además hay erosiones y costras y en ambas rodillas placas hiperpigmentadas.

Paciente 11

Varón panameño de 18 años de edad (figura 48).



Figura 48. Paciente 11. En la única foto que disponemos de este paciente se aprecia la presencia de hipo e hiperpigmentación en la cara y de una placa blanquecina, engrosada e irregular en la mucosa oral que se extiende hasta el labio (leucoqueratosis).

Paciente 12

Mujer panameña de 30 años (figuras 49 y 50), madre de los pacientes 8 y 9.



Figura 49. Paciente 12. Se aprecia hipo e hiperpigmentación cutánea, el mismo defecto en el esmalte que en la paciente número 9, caries y la pérdida de varias piezas dentales. Además se puede ver la retracción de las encías que dejan expuestas las raíces, lo que facilita la pérdida de las piezas dentales. En las manos se observa una intensa atrofia con la piel muy fina y lisa “en papel de fumar”.



Figura 50. Paciente 12. La poiquilodermia es más intensa en tronco, espalda y extremidades, con grandes manchas hiperpigmentadas. En las fotografías no se observan erosiones ni costras.

Paciente 13

Varón panameño de 13 años (figura 51), hermano de los pacientes 14 y 15.



Figura 51. Paciente 13. Presenta manchas hiperpigmentadas generalizadas, más llamativas en el tórax y el abdomen. Se observan múltiples erosiones y costras en las extremidades superiores, posibles restos de ampollas en fase de curación. No disponemos de fotografías de manos y pies por lo que no podemos valorar la existencia de atrofia cutánea en la localización más usual en los pacientes SK.

Paciente 14

Mujer panameña de 4 años (figuras 52 y 53), hermana de los pacientes 13 y 15.



Figura 52. Paciente 14. En los incisivos superiores se aprecia el defecto del esmalte ya visto en otros pacientes y caries. La hipo e hiperpigmentación está presente en la cara, el cuello, el tórax, el abdomen y las extremidades, aunque de forma moderada. En el abdomen, las extremidades superiores y sobre todo en los muslos y las rodillas se pueden ver grandes erosiones y costras.



Figura 53. Paciente 14. La piel del dorso de las manos y de los brazos se ve fina y arrugada. En los brazos y el abdomen se ven además algunas manchas violáceas de gran tamaño.

Paciente 15

Varón panameño de 9 años de edad (figura 54), hermano de los pacientes 13 y 14.



Figura 54. Paciente 15. Presenta una intensa discromía por todo el cuerpo, resultando más llamativa la hiperpigmentación en el tórax y el abdomen, con grandes manchas de color parduzco. En la espalda se aprecian numerosas erosiones y costras, grandes manchas hiperpigmentadas y atrofia de la piel.

5.2. Estudio histológico y de inmunofluorescencia

Estudio histológico

En los cortes histológicos realizados se han encontrado una serie de hallazgos comunes a todos los pacientes SK. En las figuras 55 y 56 se describen algunos ejemplos de estos hallazgos.

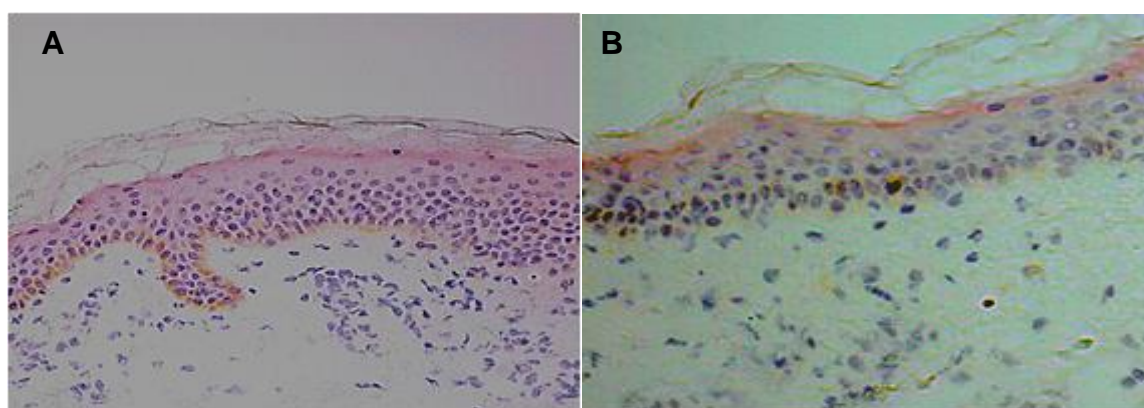


Figura 55. Estudio histológico. A. Control sano. En la figura se aprecia una arquitectura epidérmica normal tanto en el número de capas como en el aspecto y distribución de las células y del pigmento. Hematoxilina-eosina 20x **B** Paciente 9. Se observa atrofia de la epidermis, que muestra menos capas en el estrato espinoso, engrosamiento de la capa córnea e incontinencia pigmentaria, es decir, melanina liberada por la rotura de melanocitos y expulsada a la dermis, donde es fagocitada por melanófagos. Hematoxilina-eosina 20x

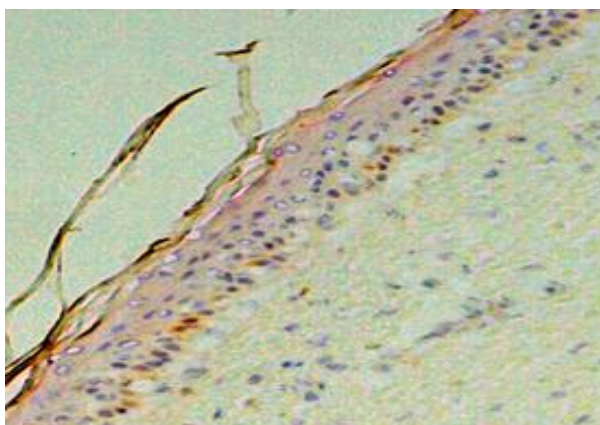


Figura 56. Estudio histológico del paciente 10. En la imagen se puede apreciar la degeneración hidrópica de los queratinocitos basales, que sufren un proceso de vacuolización intra y extracelular que conduce a la falta de continuidad en la capa basal. Como en las anteriores imágenes hay una clara atrofia epidérmica, con disminución del estrato espinoso y ausencia de la granulosa. Se observa paraqueratosis, es decir, núcleos en la capa córnea. Hematoxilina-eosina 200x.

Inmunofluorescencia

Se ha realizado inmunofluorescencia indirecta frente a colágeno IV, colágeno VII, integrinas $\beta 1$, $\beta 4$, $\alpha 6$ y laminina-3322. Los resultados se muestran entre las figuras 57 y 61.

Aunque no disponemos de fotografías del estudio de inmunofluorescencia de los pacientes 1 y 4, el informe de la Dra. Zambruno de dichos pacientes indica que los estudios se han hecho, evidenciando la duplicación de la membrana basal. No tenemos noticia de que estos estudios se hayan llevado a cabo en los pacientes 2, 3 y 5.

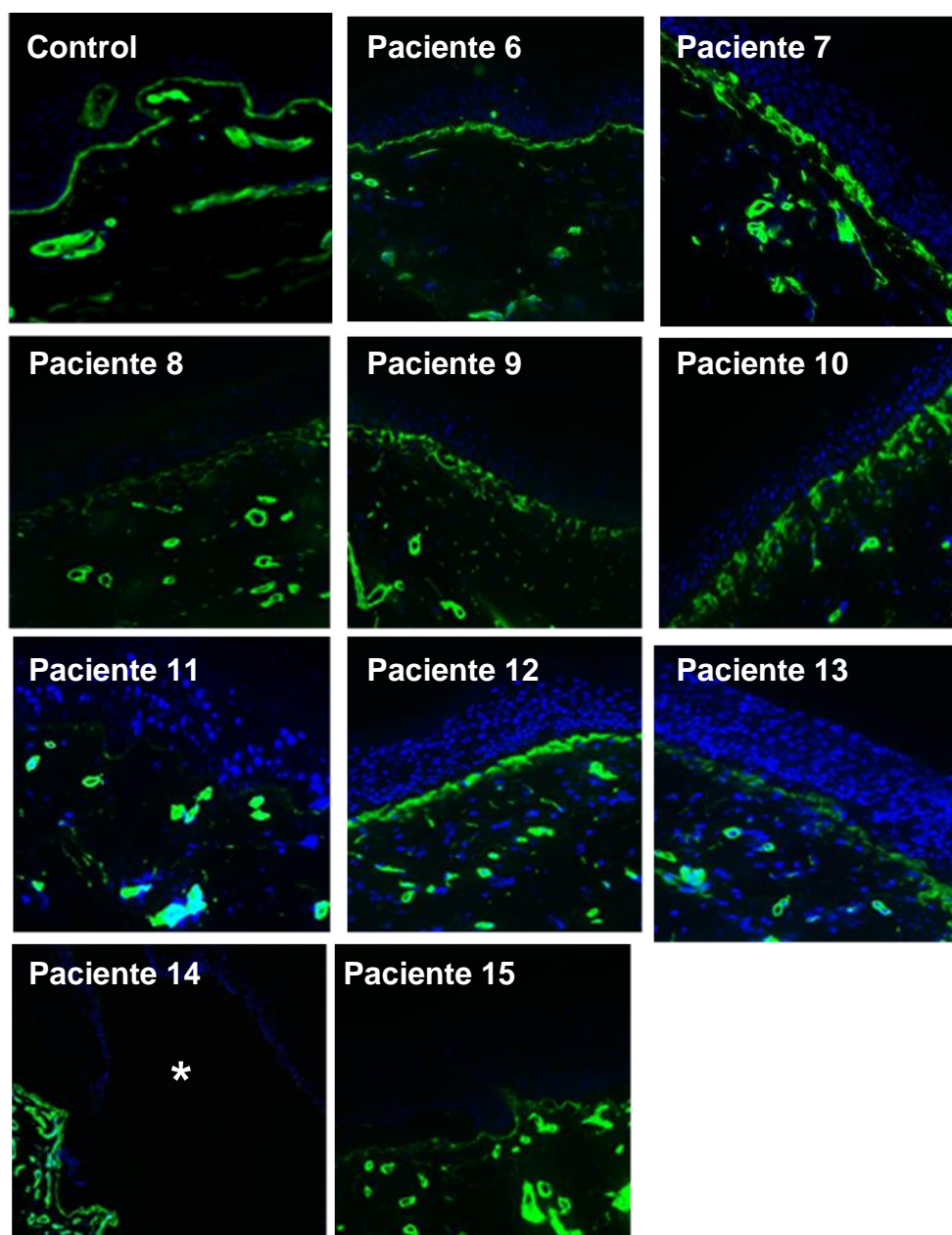


Figura 57. Inmunofluorescencia frente a colágeno IV, 200x. En la muestra de control el marcaje fluorescente es lineal y continuo. En los pacientes 7, 8, 9, 10, 12, 13 y 15 se demuestra la reduplicación de la lámina densa, caracterizada por una fluorescencia ancha, reticulada y en ocasiones discontinua por las rupturas puntuales de la membrana basal. En los pacientes 6, 11 y 14 no se observa esta característica. En todas las muestras del paciente 14, la epidermis estaba separada de la dermis (asterisco), dificultando su estudio histológico.

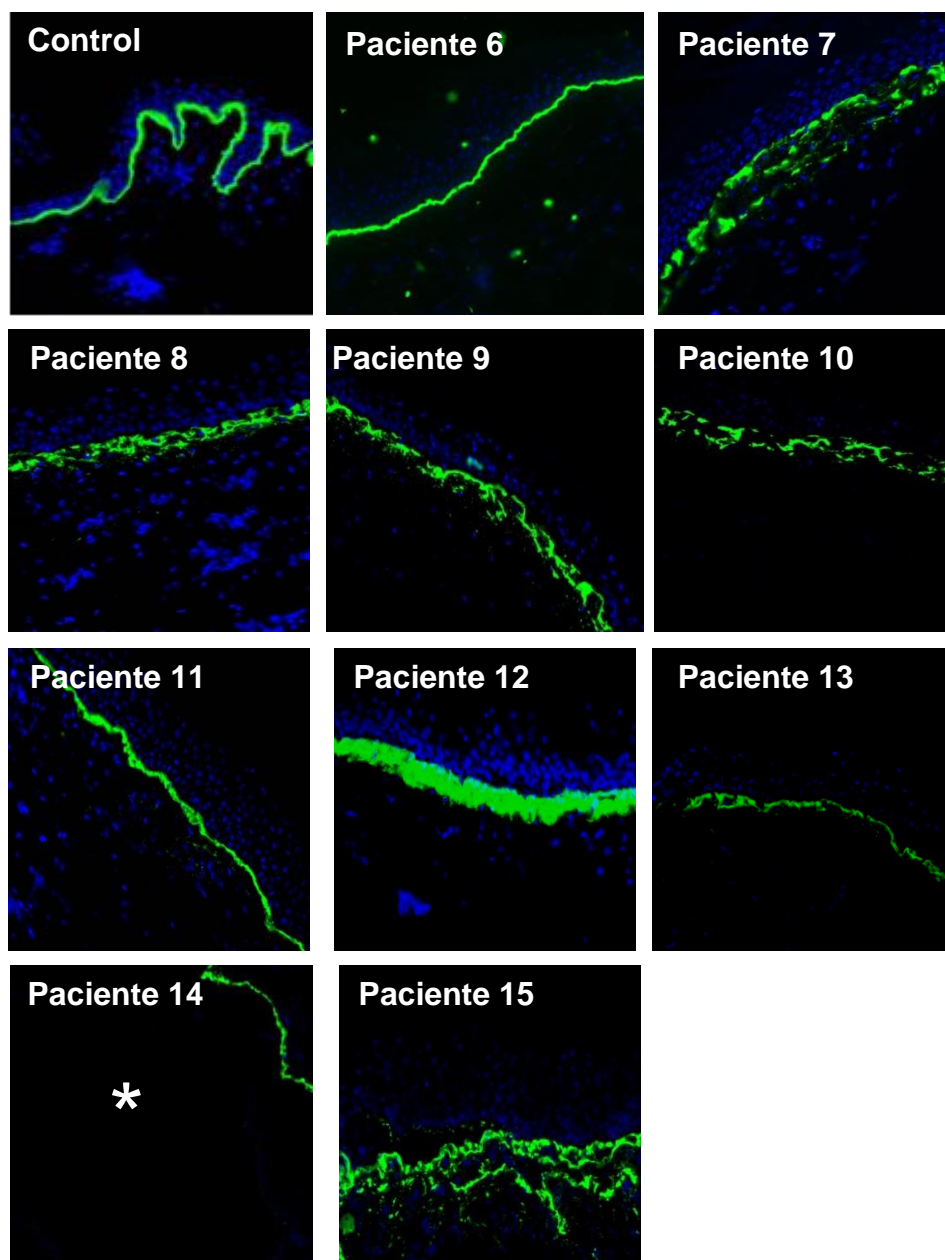


Figura 58. Inmunofluorescencia frente a colágeno VII, 200x. Al igual que ocurre con la tinción frente a colágeno IV, el marcaje es ancho, reticulado y en ocasiones fragmentado. La reduplicación de la lámina densa de la membrana basal tampoco en este caso está presente en los pacientes 6, 11 y 14, como en la muestra de piel control, observándose una tinción lineal, fina y continúa.

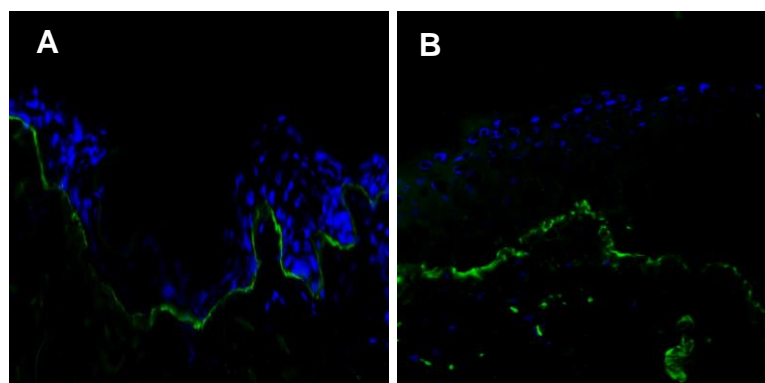


Figura 59. Inmunofluorescencia frente a laminina-332, 200x. Control y paciente 13 .A. Control sano con marcaje lineal y fino. **B.** El paciente 13 muestra un marcaje ancho y discontinuo.

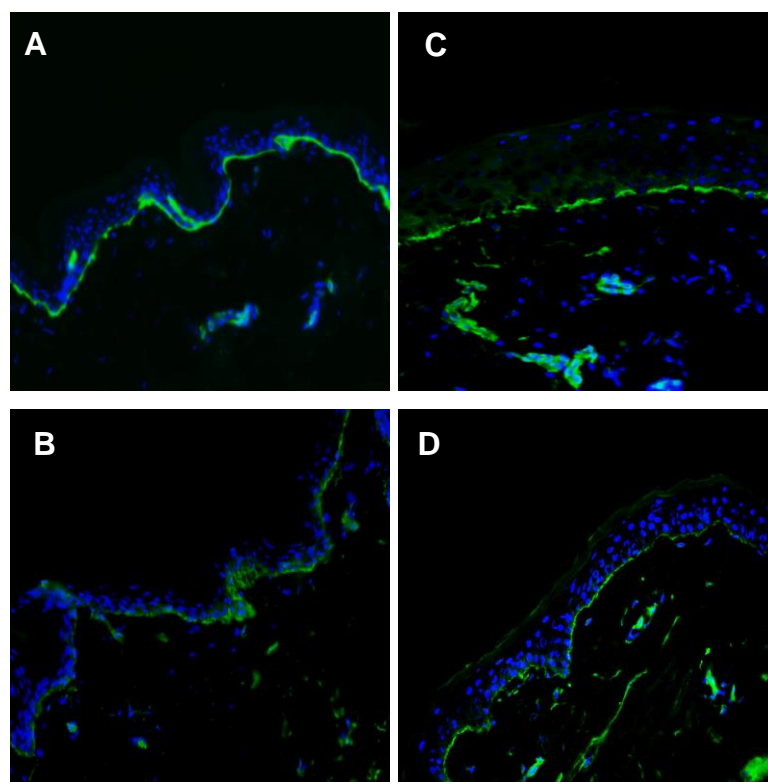


Figura 60. Inmunofluorescencia frente a integrinas $\beta 4$ y $\alpha 6$, 200x. A y B. Marcaje para $\beta 4$ y $\alpha 6$ respectivamente, en control sano. **C y D.** Marcaje para $\beta 4$ y $\alpha 6$ en los pacientes 13 y 15, respectivamente. El marcaje en no muestra diferencias de grosor ni de intensidad de la señal respecto a la muestra de piel de un control sano, aunque en ellos sí se observan disrupciones en la membrana basal.

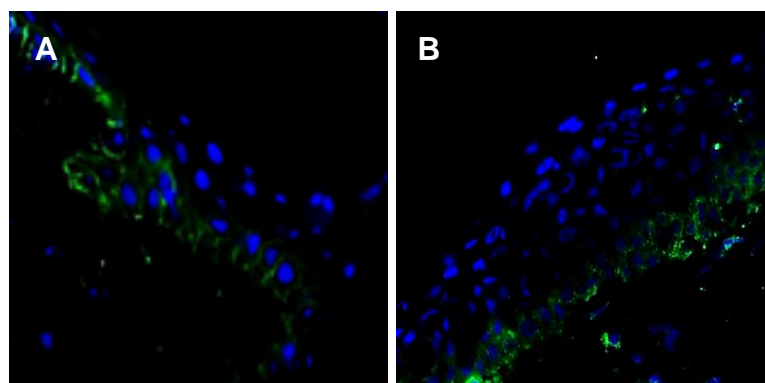


Figura 61. Inmunofluorescencia frente a integrina $\beta 1$, 400x. A. Control sano. **B.** Paciente 6. No se observan diferencias de grosor ni de intensidad del marcaje en la muestra del paciente número 6 respecto a la muestra control.

5.3. Estudio genético

Después de realizar el estudio genético se ha comprobado que los pacientes incluidos en este trabajo son portadores de las siguientes mutaciones (tabla 5).

Tabla 5. Mutaciones identificadas en los pacientes incluidos en esta tesis

Pacientes	Mutaciones
1 a 3	FERMT1: [c.1264+1G>A (ex10)];[c.1264+1G>A (ex10)]
4	FERMT1:[c.1371+4A>G (ex11)];[c.1371+4A>G (ex11)]
5	FERMT1:[c.1378C>T;p.Gln460Term (ex12)];[c.1867_1869delATC;p.Ile623del(ex15)]
6	FERMT1:[c.1198T>C;p.Ser400Pro (ex10)];[c.1198T>C;p.Ser400Pro (ex10)]
7	FERMT1: [c.1264+362_1373-603del];[c.1264+362_1373-603del]
8 a 15	FERMT1: [c.811C>T (ex6)];[c.811C>T (ex6)]

RESULTADOS

Los **pacientes 1, 2 y 3** presentan la mutación FERMT1: [c.1264+1G>A (ex10)];[c.1264+1G>A (ex10)] y la **paciente 4**, la variante FERMT1:[c.1371+4A>G (ex11)];[c.1371+4A>G (ex11)]. El diagnóstico de estos pacientes fue realizado en el laboratorio de la Dr. Zambruno y todos ellos fueron incluidos en el artículo de la Dr. Has del año 2011, donde se describe que ambas mutaciones dan lugar a un splicing alternativo que produce la pérdida funcional de la proteína (Has et al, 2011).

La **paciente 5** porta las mutaciones FERMT1:[c.1378C>T;p.Gln460Term (ex12)]; [c.1867_1869delATC;p.Ile623del(ex15)] (figura 62) y también fue incluida en el artículo de la Dra. Has del año 2011. La variante nonsense c.1378C>T en el exón 12, da lugar al cambio del aminoácido Glutamina por un codon stop, produciendo el fin prematuro de la síntesis de la proteína y la pérdida de su función. La delección de tipo in-frame c.1867_1869delATC en el exón 15, afecta al subdominio F3, cerca del sitio de unión para beta1 integrina (Has et al, 2011).

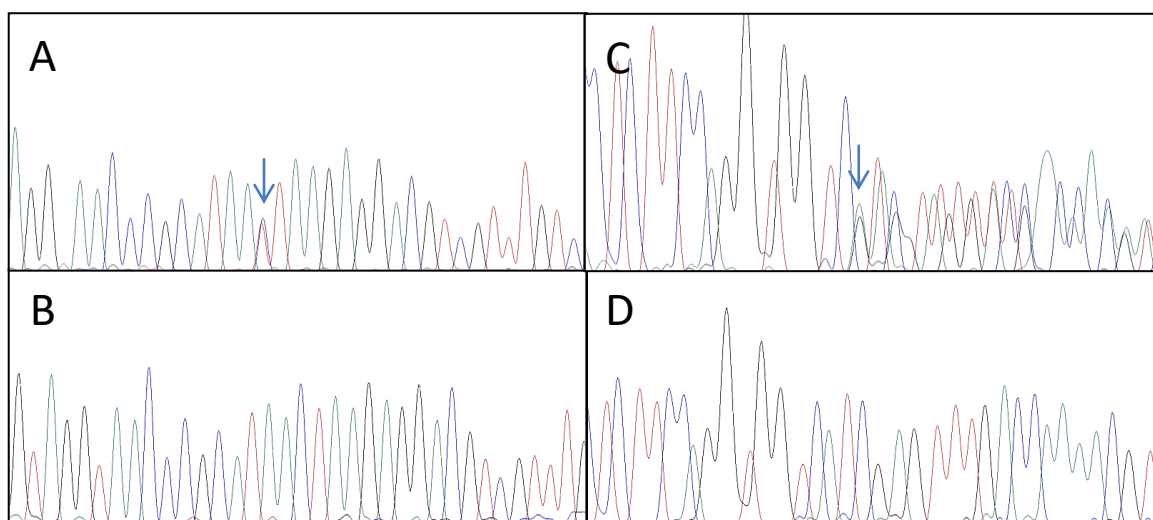


Figura 62. Cromatogramas del paciente 5 y del control sano A. Variante c.1378C>T, exón 12. **B.** Control sano del exón 12 **C.** Delección c.1867_1869delATC, en el exón 15. **D.**Control sano del exón 15.

RESULTADOS

La **paciente 6** presenta la mutación FERMT1:[c.1198T>C;p.Ser400Pro (ex10)];[c.1198T>C;p.Ser400Pro (ex10)] (figura 63), en la que se produce la sustitución del aminoácido Serina por Prolina en el dominio PH. Este caso, el primero con una mutación missense de FERMT1, fue incluido en el artículo de la Dra. Has del año 2011. La Dra. Has sugiere que esta mutación podría dar lugar a la expresión de una proteína mutada, aunque las consecuencias moleculares de esta sustitución de aminoácidos aún no han sido confirmadas (Has et al, 2011).

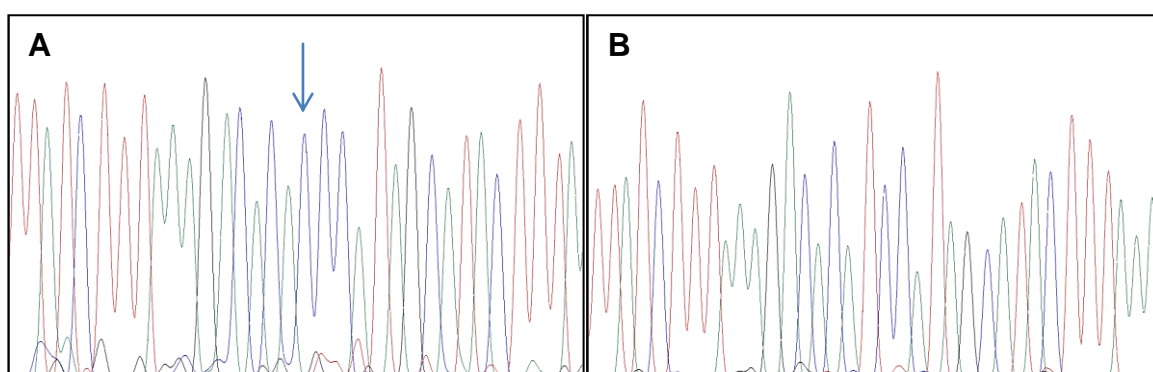


Figura 63. Cromatogramas del paciente 6 y control. A. Variante c.1198T>C en el exón 10. B. Control sano del exón 10.

La **paciente 7** presenta la variante FERMT1: [c.1264+362_1373-603del];[c.1264+362_1373-603del], descrita recientemente por la Unidad de Medicina Regenerativa del CIEMAT. Esta variante produce splicing alternativos que dan lugar a la pérdida del exón 11 o del exón 10 y 11 (figura 64)

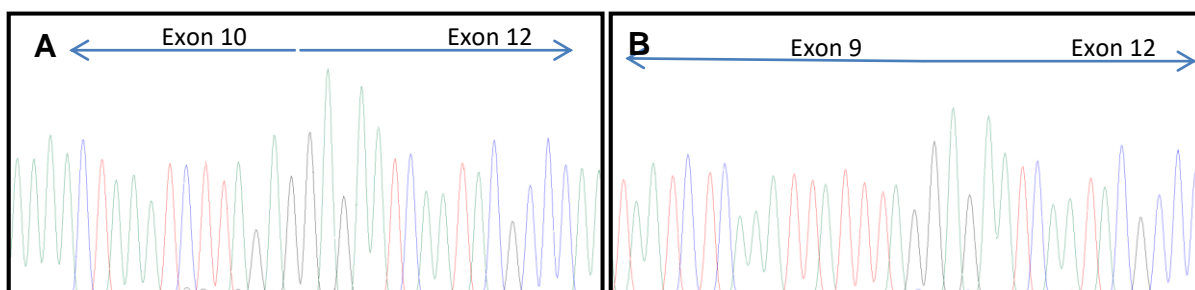


Figura 64. Cromatogramas del paciente 7. A. Delección del exón 11. B. Delección de los exones 10 y 11.

En los **8 pacientes panameños**, identificamos la mutación FERMT1: [c.811C>T (ex6)];[c.811C>T (ex6)] (figura 65). Esta variante nonsense produce el cambio de una Arginina por un codon stop (R271X), produciendo el fin prematuro de la síntesis de la proteína y la pérdida completa de su función.

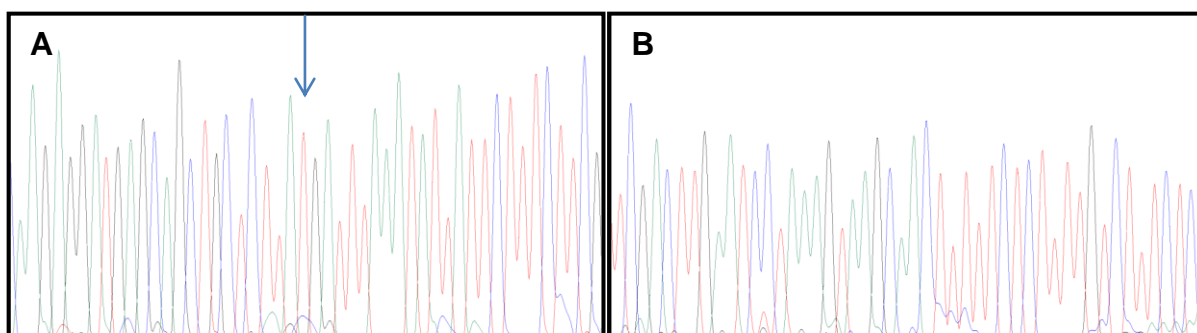


Figura 65. Cromatogramas del exón 6 mutado y del control. A. Mutación c.811C>T en homocigosis en el paciente 10. **B.** Paciente control.

Esta mutación fue descrita por Siegel y colaboradores en el año 2003, en 26 pacientes procedentes de la misma población que nuestros individuos de estudio. Simultáneamente encontró la misma mutación en 2 familias caucásicas de Estados Unidos y en 1 familia de Omán.

5.4. Modelo humanizado en ratón

El modelo de ratón humanizado en piel, a través del transplante de piel humana bioingenierizada, ha abierto un gran abanico de posibilidades de recreación fidedigna de diversas patologías cutáneas.

La reconstrucción de enfermedades humanas in vivo puede ser empleada para comprender mejor sus mecanismos patogénicos y como plataforma para valorar nuevas herramientas terapéuticas. En nuestro caso, este modelo podrá ser utilizado en un futuro para el ensayo de terapia génica.

El modelo de ratón humanizado de SK se llevó a cabo a partir de muestras de piel de los pacientes 4, 6 y 1, como previamente se ha descrito en el apartado material y métodos.

Tres meses después del trasplante, la piel humana ofrecía un aspecto distintivo frente a la piel de ratón que la rodea. Figura 66.

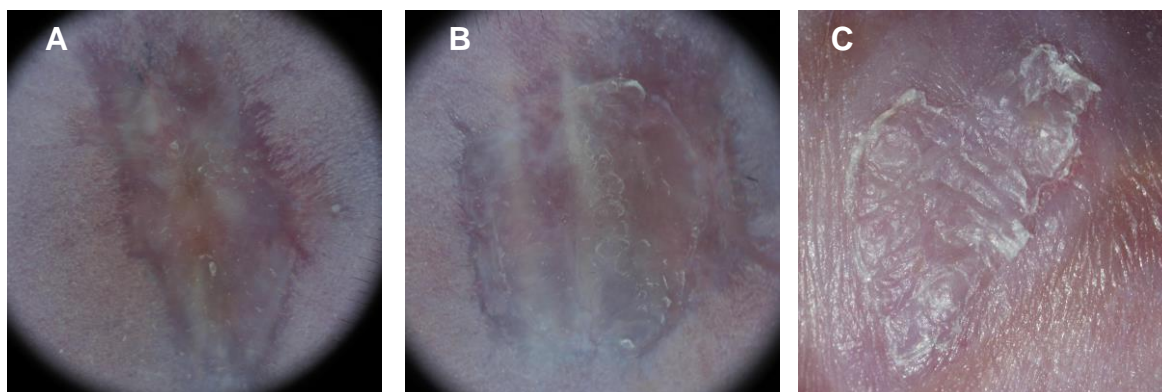


Figura 66. Piel humana trasplantada. A y B. Piel analizada con dermatoscopia. Modelo realizado a partir de la piel de los pacientes 4 y 6, revisado a los 2 meses del trasplante. La piel, aún en proceso de toma, muestra un aspecto más fino que la piel circundante. C. Modelo generado a partir de la piel del paciente 13, analizado a los 3 meses. La piel humana presenta un aspecto macroscópico notablemente más fino y rugoso que la piel del ratón que la rodea.

Para confirmar que se trata de piel humana y que reproduce el fenotipo característico del SK, tomamos una muestra de 2mm mediante punch. Sobre esta muestra y sobre una piel sana de piel bioingenierizada se realizaron inmunofluorescencias indirectas contra involucrina, colágeno IV, colágeno VII y laminina-1 (figuras 67 a 71). El modelo generado a partir del paciente 6 no mostró reduplicación de la membrana basal, igual que el paciente (figura 70).

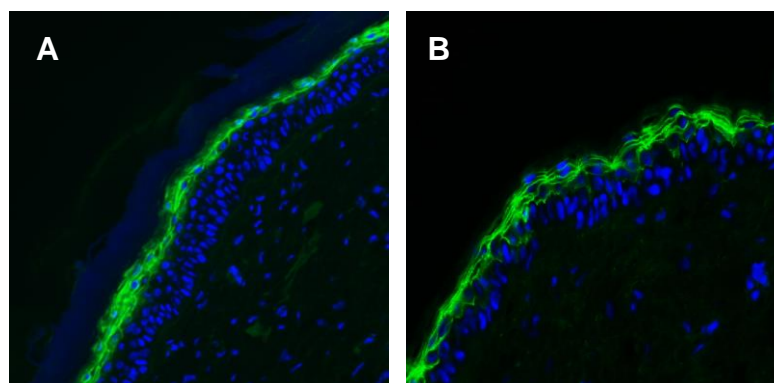


Figura 67. Inmunofluorescencia indirecta frente a involucrina humana, 200x. A. Control de piel humana. **B.** El modelo de ratón realizado a partir de la muestra del paciente 10 muestra marcaje en el estrato espinoso, al igual que el control, lo que indica el origen humano de la muestra.

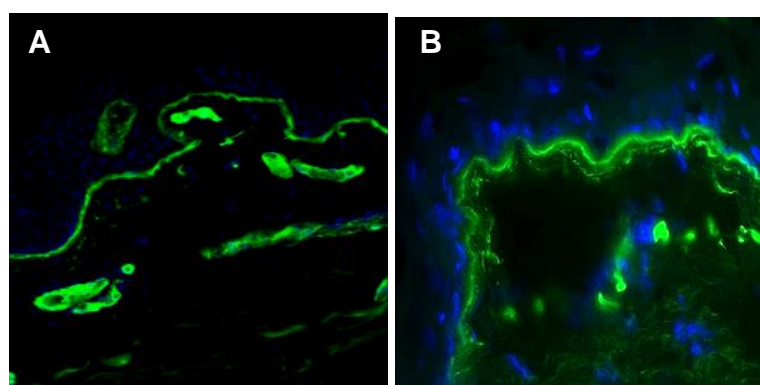


Figura 68. Inmunofluorescencia indirecta frente a colágeno IV, 200x. A. Control sano. **B.** El modelo de ratón realizado a partir de la muestra del paciente 4 muestra una reduplicación de la membrana basal al igual que la biopsia del paciente (imagen no disponible) y por lo tanto reproduce su fenotipo.

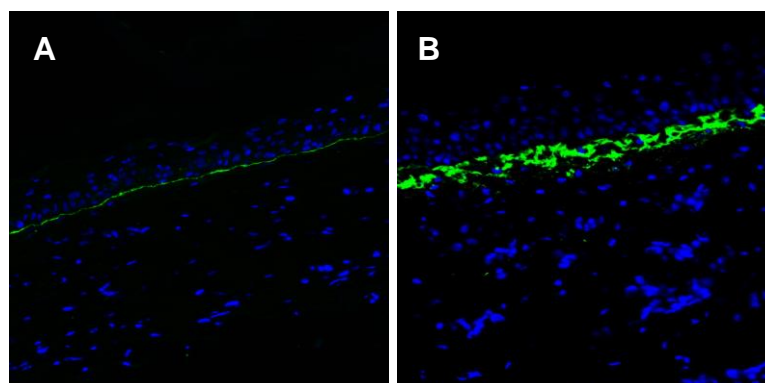


Figura 69. Inmunofluorescencia indirecta frente a colágeno VII, 200x. A. En el control de trasplante se ve un marcaje lineal y fino. **B.** La piel generada a partir del paciente 13 muestra al igual que el un aspecto engrosado y reticulado, con zonas donde se interrumpe su continuidad.

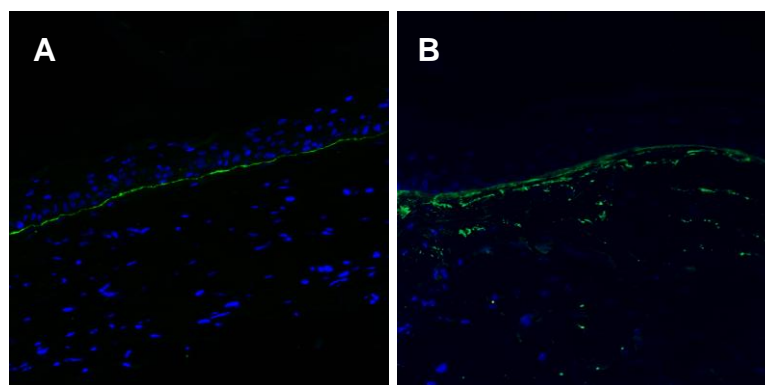


Figura 70. Inmunofluorescencia indirecta frente a colágeno VII, 200x. A. En el control de trasplante se aprecia un marcaje lineal y fino. **B.** Ausencia de reduplicación de la membrana basal en la piel generada a partir de la muestra del paciente 6.

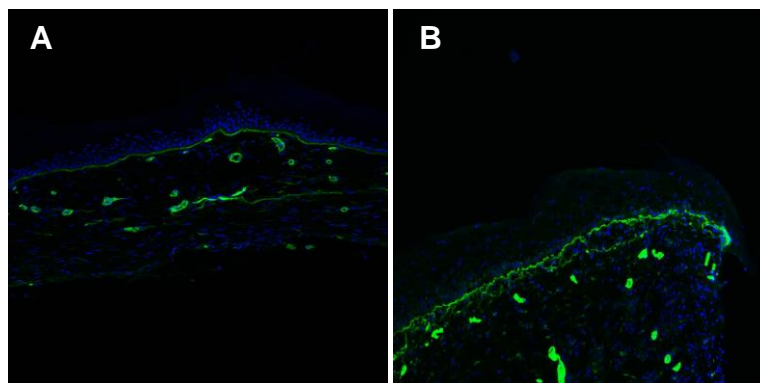


Figura 71. Inmunofluorescencia indirecta frente a laminina-1, 200x. A. Control. **B.** Modelo de ratón del paciente 13. En ambas muestras se aprecia un marcaje en zonas fuera de la membrana basal, debido a que laminina 1 se expresa también en la dermis. En la piel SK se ve claramente la reduplicación de la membrana basal.

6.1. Nuestra población de estudio y su importancia.

Hasta la fecha se ha publicado la existencia de 250 individuos diagnosticados de SK, sin que se disponga de otros datos sobre la incidencia o prevalencia de la enfermedad (Orphanet Report Series, 2019)

De los 320 casos de EB recopilados en la Unidad de Medicina Regenerativa del CIEMAT, 8 corresponden a pacientes afectados por SK, lo que supone el 2,5 % del total. Nuestra población de estudio incluye a 7 de estos sujetos.

En la tribu panameña Ngöbe-Buglé, se encuentra el grupo más numeroso de pacientes de SK del mundo, con un total de 26 sujetos. Los Ngobe Buglé viven en pequeños pueblos aislados en un territorio atravesado por la Cordillera Central de Panamá, por lo que son poblaciones con un alto nivel de endogamia. La incidencia estimada para esta comunidad es de aproximadamente 21 casos/100000 habitantes (Siegel et al, 2003). En este trabajo disponemos de una muestra representativa (8 pacientes) de la población con mayor número de casos de SK en el mundo,

Por lo tanto nuestra población de estudio comprende 10 mujeres (7 procedentes de la Unidad de Medicina Regenerativa del CIEMAT y 3 procedentes de Panamá) y 6 varones (todos ellos de Panamá), con edades comprendidas entre los 7 y 71 años. Resulta llamativo que los 7 casos que hemos incluido, de los 8 pacientes recopilados en el CIEMAT, sean mujeres, sin embargo, el SK afecta por igual a ambos sexos (Penagos et al, 2004; Has et al, 2011; Youssefian et al, 2015).

6.2. Estudio clínico

De forma general podemos decir que la presencia de ampollas congénitas o desde la primera infancia es una constante en la historia clínica de estos pacientes, al igual que la atrofia en el dorso de manos y palmas, la fotosensibilidad y la poquilodermia.

A continuación se pasa a comparar los hallazgos clínicos en nuestros pacientes con los descritos en la literatura.

Ampollas

Todos los sujetos estudiados han presentado ampollas durante la infancia, la mayoría ya en el periodo neonatal. Estas ampollas se presentan en general en zonas acras (manos y pies), aunque en el paciente 5 fueron generalizadas. Pueden estar presentes a las pocas horas de vida o aparecer tras el primer año, ser espontáneas o asociadas a traumatismo, en ocasiones son hemorrágicas (paciente 7) y en algunos pacientes curan dejando cicatriz (paciente 4). Nuestros pacientes adultos no presentan ampollas, aunque dos de ellos sí muestran erosiones en la boca (pacientes 2 y 3).

En concordancia con lo descrito en nuestros pacientes, en la literatura científica se recoge que las ampollas están o han estado presentes en el 100% de los pacientes de SK. Suelen ser congénitas, es decir, estar presentes en el momento del nacimiento, producidas por el trauma en el canal del parto durante la expulsión, por los medios que se tienen que emplear para la extracción del feto e incluso por la pulsera de identificación (figura 72). Generalmente se producen en las zonas acras, es decir, manos y pies, la curación suele ser lenta, pueden o no dejar cicatrices y su número decrece sobre los 10 o 12 años (Siegel et al, 2003; Penagos et al, 2004; Has et al, 2011)



Figura 72. Ampollas acrales en paciente SK. Imagen tomada de Penagos et al, 2004.

Fotosensibilidad

En la historia clínica de los pacientes recopilados por la Unidad de Medicina Regenerativa del CIEMAT no está recogida la presencia de fotosensibilidad. Sin embargo, seis de ellos (nuestros pacientes 1, 2, 3, 4, 5 y 6), fueron descritos en el artículo de la Dra. Has de 2011, indicándose que salvo uno (nuestra paciente 6), todos muestran fotosensibilidad. En los pacientes panameños de este trabajo, el material documental del que disponemos no nos permite corroborar la presencia de fotosensibilidad, aunque en alguna imagen como la de la paciente 9 parece intuirse un leve enrojecimiento facial (figura 44, página 86).

En concordancia con lo descrito en nuestros pacientes, en la literatura científica se recoge que la fotosensibilidad no es una característica constante de SK. Así, en el artículo de la Dra. Has de 2011 se indica que el 24% de los pacientes recogidos en su estudio no refiere fotosensibilidad. En los pacientes de la cohorte panameña descritos por el Dr. Penagos en 2004, el 92% presenta o ha presentado fotosensibilidad, siendo el caso más precoz al mes de vida y la media de edad de aparición de 2 años (Penagos et al, 2004). Además es un síntoma que suele disminuir progresivamente con la edad, aunque puede persistir con la aparición de eritema ante una mínima exposición solar (Has et al, 2011).

Atrofia

La atrofia cutánea en dorso de manos y pies esá presente en todos nuestros pacientes, incluyendo los más jóvenes.

En concordancia con lo descrito en nuestros pacientes, la literatura científica recoge la atrofia cutánea como una característica constante y primer síntoma indicativo de SK en niños (Has et al, 2011) (figura 73). La atrofia suele generalizarse en la adolescencia, extendiéndose a abdomen, piernas, rodillas y codos (Jobard et al, 2003). La atrofia y la fragilidad cutánea parecen cursar con el agotamiento prematuro de la célula madre epidérmica (Dra. Zambruno, datos no publicados).



Figura 73. Atrofia cutánea en el dorso de las manos. Imagen tomada de Penagos et al, 2004.

Poiquilodermia

La poiquilodermia, definida como la presencia de placas de atrofia, hipo e hiperpigmentación y teleangiectasias, está presente en todos nuestros pacientes, siendo más intensa en los sujetos panameños.

En concordancia con lo descrito en nuestros pacientes, la literatura científica recoge que la poiquilodermia es un síntoma constante de SK, que en general no está presente al nacimiento. Suele aparecer entre los 2 y 3 años de edad y en algunos individuos se generaliza ya en la edad adulta, extendiéndose a áreas expuestas o no al sol, lo que indica que no es solo causada por el daño solar (Penagos et al, 2004; Has et al, 2011).

Hiperqueratosis de palmas y plantas

Entre los casos estudiados solo la paciente 6 muestra hiperqueratosis palmar, que se acompaña de manos de aspecto esclerodermiforme y tendencia a la flexión ventral. Además presenta pérdida de dermatoglifos, al igual que el paciente 10.

En los datos recogidos en la literatura científica la hiperqueratosis palmar y plantar, al igual que la afectación esclerosa de manos y dedos es más habitual que lo observado en nuestros pacientes. La hiperqueratosis palmar y plantar se observa en aproximadamente el 65% de los pacientes de SK y en ocasiones conlleva la pérdida de las crestas dérmicas y dermatoglifos (Youssefian et al, 2015). En el 81% de los pacientes panameños descritos por el Dr. Penagos se observa hiperqueratosis en palmas y plantas, en ocasiones con pérdida de las huellas dactilares o dermatoglifos. En 3/26 pacientes se encuentra la fusión parcial entre dedos, posiblemente por los traumatismos o ampollas repetidas (Penagos et al, 2004)

Uñas

Los pacientes 2, 3 y 6 presentan pérdida de uñas y esta última además hipercurvatura ungueal.

En concordancia con lo descrito en nuestros pacientes, en la literatura científica se describe distrofia ungueal, con adelgazamiento de las uñas, atrofia y onicolisis (Jobard et al, 2003; Penagos et al, 2004).

Alteraciones en la mucosa bucal y periodontal.

En nuestros pacientes se encuentra un amplio espectro de afectación de la mucosa bucal y periodontal que incluye:

- Microstomía, es decir, una reducción en el tamaño de la abertura oral. Se identifica en los pacientes 2 y 3, que como ya se comentó son hermanas.
- Queilitis angular, definida como la presencia de lesiones inflamatorias en la comisura labial. Está presente en la paciente 6
- Erosiones/aftas bucales. Se aprecian en los pacientes 1, 2, 3, 5 y 6
- Leucoqueratosis, es decir, placas blanquecinas en la mucosa oral. Son visibles en los pacientes 6 y 11.

- Gingivitis o inflamación de las encías. Se observa en los pacientes 3 y 10

- Periodontitis, una enfermedad que cursa inicialmente con gingivitis, para proseguir con una pérdida de la inserción colágena, recesión gingival y la pérdida de hueso, dejando sin soporte óseo al diente, que finalmente se pierde. Se describe en la historia clínica de la paciente 5.

- Defectos del esmalte. Están presentes en los pacientes 2 y 4. En los pacientes 9, 12 y 14 se aprecia un defecto del esmalte de tipo amelogénesis imperfecta, caracterizado porque los dientes son cubiertos por un esmalte delgado que se forma de manera anormal. El esmalte se fractura y se daña fácilmente, lo cual afecta la apariencia de los dientes, especialmente si se no se trata.

- Caries. Está presente en los pacientes 1, 3, 6, 9, 12 y 14.

- Pérdida de piezas dentales. Se observa en los pacientes 6, 10, 12

La afectación de encías y dientes, que aparece desde una edad temprana, podría aparecer antes y ser más grave por una poco adecuada higiene bucal y por una falta de revisiones dentales que podrían retrasar o evitar el desarrollo de complicaciones como la periodontitis y la pérdida de piezas dentales.

En concordancia con lo descrito en nuestros pacientes, en la literatura científica se recoge que los pacientes de SK presentan muy a menudo alteraciones en la mucosa oral, incluyendo de mayor a menor frecuencia la periodontitis agresiva con pérdida de piezas dentales, gingivitis con sangrado de encías, leucoqueratosis, ulceración oral, halitosis, dentición pobre, queilitis angular, microstomía, gingivitis descamativa, caries, erosión de labios y xerostomía (Wiebe et al, 2008). El 86% de los pacientes panameños descritos por el Dr. Penagos presentan enfermedad periodontal severa, que comienza frecuentemente en la adolescencia y que conlleva en algunos casos la pérdida prematura de dientes (Penagos et al, 2004).

Tracto Digestivo

El material documental del que disponemos de los pacientes panameños incluidos en este estudio no nos permite valorar la presencia de alteraciones en el tracto digestivo. Entre los restantes pacientes, el caso 5 es el que presenta una mayor afectación gastrointestinal, con diarrea sanguinolenta a los 15 días de vida, estenosis esofágica que requiere dilataciones cada 3 o 4 años, tránsito intestinal lento, estreñimiento por úlceras en intestino grueso, fibrosis del recto y estenosis anal. Del resto de los pacientes, cuatro presentan estreñimiento (pacientes 2, 4, 5 y 7), tres fisura anal (pacientes 2, 4 y 7), dos disfagia (pacientes 3 y 6) y uno estenosis esofágica y pilórica (paciente 2).

En concordancia con lo descrito en nuestros pacientes, en la literatura científica se recogen casos de estenosis esofágica, colitis severa, diarrea sanguinolenta, estreñimiento, fisura rectal y estenosis. También se han comunicado casos de recién nacidos con ano imperforado (Lai-Cheong et al, 2010). En los artículos encontramos 9 casos de colitis inducida por epiteliolisis (Kern et al, 2007), que contrasta con el modelo de ratón knockout de kindlina-1 que mostraba una alteración letal del epitelio intestinal con un fenotipo mucocutáneo leve. Entre los pacientes panameños descritos por el Dr. Penagos uno nació con ano imperforado, que precisó cirugía (Penagos et al, 2004). Los síntomas relacionados con la afectación esofágica se inician tras los 10 años y el porcentaje de pacientes que desarrolla disfagia y estenosis se incrementa con la edad (Has et al, 2011)

Tracto Genitourinario

De nuestro grupo de estudio solo la paciente 5 muestra afectación a este nivel, con estenosis vaginal y liquen escleroso y atrófico vulvar. En la literatura científica de SK encontramos descripciones de estenosis vaginal y sinequia de los labios vulvares, además de fimosis y estenosis uretral.

El material documental del que disponemos de los pacientes panameños incluidos en este estudio no nos permite valorar la presencia de alteraciones en el tracto genitourinario, sin embargo en los pacientes descritos por el Dr. Penagos se indica la presencia de estenosis del meato uretral en 6 pacientes y fimosis en el 80% de los varones (Penagos et al, 2004).

Manifestaciones Oculares

En nuestro grupo de estudio la paciente 3 presenta ampollas/erosiones conjuntivales, posibles cicatrices corneales y dolor ocular, mientras la paciente 3 refiere xeroftalmia.

En concordancia con lo descrito en nuestros pacientes, en la literatura científica se recogen casos de ectropion, erosiones y cicatrices corneales, blefaritis, y queratoconjuntivitis (Jen y Nallasamy, 2016).

Predisposición a cáncer

En nuestros pacientes no tenemos constancia del desarrollo de ningún tipo de tumor, aunque la paciente 5 presentó una lesión sospechosa de carcinoma escamoso en el párpado inferior izquierdo, de la que no tenemos confirmación histológica.

En la literatura científica encontramos 14 casos de carcinoma de células escamosas y dos de queratosis actínica en la piel (Caldeira et al, 2016; Natsuga et al, 2011; Techanukul et al, 2011; Cardin- Langlois et al, 2010; Has et al, 2006, 2008, 2010, 2011; Arita et al, 2007; Emanuel et al, 2006; Ashton et al, 2004; Lanschuetzer et al, 2003; Lotem et al, 2001). La mutación que con mayor frecuencia se asocia a Carcinoma de células escamosas (tres casos), es c.328C>T en el exón3, que da lugar a un codón de parada prematuro (p.R110X).

Los autores sugieren que la predisposición al desarrollo de carcinoma de células escamosas en los pacientes de SK, podría deberse a la repetición de ciclos daño-reparación o a la deposición anómala de proteínas en la matriz extracelular.

Ante diversos estímulos como la inflamación, el trauma mecánico, la activación de TGF- β o el estrés oxidativo, los fibroblastos dérmicos se activan, adquiriendo un fenotipo proliferativo caracterizado por una producción anómala de proteínas de la matriz extracelular. En condiciones normales, cuando el estímulo cesa, los fibroblastos regresan a su estado original mediante la reprogramación o la apoptosis. Sin embargo, en genodermatosis como SK o EBD recesiva (páginas 23 y 24), que muestran un fenotipo complejo que incluye una intensa fibrosis y predisposición al cáncer, el daño y el estímulo son crónicos, de manera que los fibroblastos permanecen activados adquiriendo características similares a las de los fibroblastos asociados a tumor (CAFs) y a fibrosis (FAFs) (Chacón-Solano et al, 2012).

En el caso del SK, Heinemann y colaboradores demostraron que los queratinocitos deficientes en kindlina-1 responden al estrés celular aumentando la expresión de moléculas inflamatorias, activando la vía de señalización TGF- β , la activación de fibroblastos y su diferenciación a miofibroblastos, con un incremento en el depósito de proteínas de la matriz extracelular (Heinemann et al, 2011). Además, los queratinocitos de pacientes de SK son células propensas al estrés oxidativo al presentar alteraciones en la estructura, distribución y funcionalidad de las mitocondrias y un desequilibrio entre radicales libres y antioxidantes (Zapatero-Solana et al, 2014). Todo ello podría explicar algunas características del fenotipo del SK como la fotosensibilidad, la fibrosis y la predisposición al desarrollo de carcinoma de células escamosas.

6.3. Correlación genotipo-fenotipo

La correlación genotipo-fenotipo en el SK se ve dificultada por varias causas. Por un lado, la mayor parte de las variantes de FERMT1 asociadas a SK conducen a la pérdida funcional de la proteína (variantes nulas), de manera que las variaciones fenotípicas no pueden ser explicadas por el tipo de mutación ni por su posición (Has et al, 2011). La identificación de mutaciones que dan lugar a proteínas truncadas pero con cierta funcionalidad (missense, in-frame), permite avanzar en la correlación genotipo- fenotipo. Así por ejemplo, se sugiere que las variantes missense (p.Ser400Pro, p.Trp559Arg y p.Arg297Gly) se asocian a fenotipos leves de SK (Has et al, 2011; Youssefian et al, 2015).

Otra característica que dificulta la correlación es que el fenotipo del SK es progresivo, de manera que las ampollas y la fotosensibilidad son más llamativas y frecuentes en la infancia mientras que en los sujetos adultos se incrementa la poiquilodermia, las alteraciones del tracto digestivo y el riesgo de padecer cáncer. Por lo tanto, no encontraremos el mismo cuadro clínico y complicaciones en la infancia, adolescencia y madurez (Has et al, 2011).

Por otra parte, se ha observado que en las mutaciones nulas existe una variabilidad fenotípica que podría ser explicada por factores ambientales y/o epigenéticos que condicionan las manifestaciones de la enfermedad (Has et al, 2011).

A continuación enfrentaremos las características clínicas y las mutaciones encontradas en nuestro grupo de estudio a lo descrito sobre las mismas mutaciones o similares

6.3.1. Pacientes 1, 2 3 y 4

En los tres primeros pacientes se ha identificado la mutación FERMT1: [c.1264+1G>A (ex10)];[c.1264+1G>A (ex10)] y en el cuarto la variante FERMT1:[c.1371+4A>G (ex11)];[c.1371+4A>G (ex11)]. Ambas mutaciones dan lugar a splicing alternativos que conllevan la terminación prematura de la traducción (Has et al, 2011).

No se han encontrado, en las distintas bases de datos ni en los artículos publicados hasta la fecha, otros sujetos con estas variantes y nuestros pacientes muestran fenotipos similares a los comunmente descritos en los pacientes de SK.

6.3.2. Paciente 5

Presenta las mutaciones FERMT1:[c.1378C>T;p.Gln460Term (ex12)]; [c.1867_1869delATC;p.Ile623del(ex15)]. La variante nonsense c.1378C>T en el exón 12, da lugar al cambio del aminoácido Glutamina por un codon stop, produciendo el fin prematuro de la síntesis de la proteína y la pérdida de su función. La delección de tipo in-frame c.1867_1869delATC en el exón 15, afecta al subdominio F3, cerca del sitio de unión para beta1 integrina (Has et al, 2011).

De nuestro grupo de estudio es el sujeto con el fenotipo más extenso y severo y aunque hasta la fecha ninguna de las dos mutaciones que porta ha sido descrita en otros pacientes, podemos compararlo con 5 sujetos, tres búlgaros y dos turcos, descritos por la Dra. Has en 2008 y 2011 (tabla 6). Estos pacientes portan en homocigosis la mutación g. 80929_89169del, que conlleva la pérdida de los exones 14 y 15 y por lo tanto afecta al subdominio F3 de kindlina-1, al igual que en nuestro caso. Las consecuencias de esta delección no están claras, aunque los datos sugieren que se podría generar una proteína truncada sin los últimos aminoácidos del extremo C-terminal (Has et al, 2008).

Tabla 6. Características clínicas de pacientes con las mutaciones c.1378C>T; c.1867_1869delATC y g. 80929_89169del. + presente ++ severo – ausente

*no confirmado

c.1378C>T; c.1867_1869delATC											
23	+	+++	+	+	+	++	+	++	++	+	*
g. 80929_89169del											
Años	Ampollas	Atrofia Poiquilodermia	Fotosensibilidad	Afectación dedos	Oral	Esófago	Intestino	Anal	Urogenital	Ocular	Cáncer
3	+	+	-	-	++	-	-	-	-	-	-
7	+	+	-	-	++	-	-	-	-	-	-
36	+	+++	+	+	++	-	-	++	++	-	-
40	+	++	+	++	++	-	-	+	+	+	-
53	+	++	+	+	++	+	-	+	-	+	+

De este esquema se concluye que todos los pacientes presentan o han presentado **ampollas**, muestran **atrofia** y la **poiquilodermia** es leve en los más jóvenes y localizada o diseminada en los mayores, siendo la paciente de 36 años la que muestra una afectación más extensa, similar a la de nuestra paciente de 23 años. La **fotosensibilidad** está presente en los sujetos adultos, al igual que en nuestra paciente. Los pacientes adultos muestran **restricciones** y **contracturas** en los **dedos**, mientras en nuestra paciente se describe una afectación **esclerosa** de los mismos. Todos los pacientes muestran **periodontitis** y **pérdida** de **piezas dentales**, mientras nuestra paciente sufre **aftas orales** dolorosas permanentes y **periodontitis** con **halitosis**. Sólo el paciente de mayor edad presenta síntomas a nivel esofágico (**disfagia**), sin embargo nuestra paciente presenta desde la infancia una **estenosis esofágica severa**, que requiere dilataciones periódicas. Ninguno de los pacientes ha presentado síntomas intestinales, sin embargo nuestra paciente presentó a los 15 días de vida **diarrea sanguinolenta** y en la actualidad sufre tránsito intestinal lento y estreñimiento **por úlceras** en el **intestino grueso**.

Los pacientes adultos presentan **fisuras** o **estenosis anal**, mientras nuestra paciente muestra **fibrosis del recto** y **estenosis anal**. Una de las pacientes de la tabla presenta atresia vaginal y anal, amenorrea y fusión de los labios mayores y menores, mientras nuestra paciente presenta una stenosis vaginal intervenida en dos ocasiones y en tratamiento actual con dilataciones vaginales y liquen esclero atrófico vulvar. Por último el paciente de mayor edad desarrolló carcinomas de células escamosas en el dorso de una mano y en el labio inferior, mientras nuestra paciente presentó una lesión sospechosa de carcinoma escamoso en el párpado inferior izquierdo de la que no tenemos confirmación histológica.

De todo ello podemos concluir que aunque las variantes c.1867_1869delATC y g. 80929_89169del puedan generar una proteína truncada con alguna funcionalidad, la pérdida del subdominio F3 donde se produce la unión a $\beta 1$ integrina hace que no se atenúe el fenotipo de SK.

6.3.3. Paciente 6

Nuestra paciente presenta la mutación FERMT1:[c.1198T>C;p.Ser400Pro (ex10)];[c.1198T>C;p.Ser400Pro (ex10)], que produce la sustitución del aminoácido Serina por Prolina en el dominio PH, lo que afectaría a las funciones de señalización y organización celular de kindlina-1. La consecuencia molecular de esta sustitución aún está por establecer (Has et al, 2011).

Este caso, el primero con una mutación missense de FERMT1, fue incluido en el artículo de la Dra. Has del año 2011. En él se indica que a pesar de estar ya en la década de los cincuenta años, la paciente muestra una afectación leve y no ha desarrollado cáncer de piel. Esto sugiere que la mutación, con expresión de una proteína kindlina-1 mutada, da lugar a un fenotipo leve de SK (Has et al, 2011). Los datos recopilados de esta paciente en la Unidad de Medicina Regenerativa del CIEMAT confirman un fenotipo leve teniendo en cuenta que es el sujeto de mayor edad de nuestro estudio (51 años).

Se han descrito 2 mutaciones missense más, una de ellas c. 1675T>c (p. Trp559Arg) en el exón 13, que afecta al subdominio F2 de kindlina-1 (Has et al, 2011) y c.889A>G (p.Arg297Gly), en el exón 7, que afecta al límite entre los subdominios F1 y F2 (Youssefian et al, 2015).

En la revisión de las variantes patológicas de FERMT1 que afectan a los exones 10, 11 y 12, codificantes del dominio PH, no se ha identificado otras mutaciones susceptibles de comparación con la variante afecta a nuestra paciente.

6.3.4. Paciente 7

La paciente 7 presenta la variante FERMT1: [c.1264+362_1373-603del];[c.1264+362_1373-603del], descrita recientemente por la Unidad de Medicina Regenerativa del CIEMAT. Esta variante de splicing, identificada tras la amplificación y secuenciación de cDNA de la paciente, ocasiona transcritos alternativos con pérdida del exón 11 o de los exones 10 y 11, que afectan al dominio PH de kindlina-1, implicado en el ancaje al citoesqueleto de los queratinocitos y en la señalización mediada por integrina.

La paciente, de 7 años de edad, presentó a las pocas horas de vida, ampollas espontáneas y hemorrágicas en los pies. Estas lesiones persisten, en escasa cuantía en las manos. La piel del dorso de manos y pies, antebrazos y pantorrillas muestra atrofia, padece estreñimiento y ha sufrido fisura anal.

Aunque esta paciente es muy joven y en ella no están presentes las complicaciones propias del SK que se desarrollan con la edad, puede ser comparada con otras grandes deleciones que afectan a los exones 10 y 11 de FERMT1.

Así tenemos el caso de un paciente indio de 16 años, descrito en el año 2007 por el Dr. Arita. Este paciente portaba en homocigosis la variante de splicing c. 1140-6, que afecta al intrón 9 de FERMT1 y da lugar a la deleción del exón 10 o de los exones 9, 10 y 11, que afecta al dominio PH de kindlina-1 y produce niveles muy bajos de kindlina-1.

El paciente no mostró lesiones durante el primer año de vida pero a partir de entonces desarrolló hiper e hipopigmentación en áreas expuestas al sol, ampollas acrales y esclerosis de la piel de manos y pies. A partir de los 5 años se incrementaron los cambios escleroatróficos, con queratodermia palmoplantar, bandas constrictivas y pérdida de las falanges distales, además de distrofia ungueal. A esa edad también se hicieron visibles en el tobillo derecho unas placas hiperqueratósicas que aumentaron progresivamente de tamaño hasta que sobre ellas, diez años después, se desarrolló un carcinoma de células escamosas de gran tamaño. Además el paciente mostraba gingivitis erosiva y caries dental secundaria.

Como ya se ha comentado nuestra paciente es muy joven y aún no ha desarrollado las complicaciones propias del SK, pero ya vemos claras diferencias entre ambos sujetos, como la ausencia de anomalías durante el primer año de vida del paciente indio y el debut de SK en nuestra paciente, a las pocas horas de vida, con ampollas espontáneas y hemorrágicas en los pies. Por otra parte nuestra paciente no presenta cambios de tipo escleroatrófico ni las lesiones hiperqueratósicas que muestra el paciente indio. En el artículo del Dr. Arita se describe además que el paciente tiene dos hermanos afectados de SK con un fenotipo leve, sin esclerosis acral, alteraciones en los dedos ni cáncer.

También podemos comparar a nuestra paciente con cuatro casos descritos por Has y col en 2006 y 2011, portadores de la variante g.70250_74168del, que produce la delección de los exones 10 y 11, el fin prematuro de la traducción y una proteína truncada no funcional (Has et al, 2006) (tabla 7).

Tabla 7. Características clínicas de pacientes con las mutaciones c.1264+362_1373-603del y g.70250_74168del. + presente ++ severo – ausente NC no consta

c.1264+362_1373-603del											
7	+	+	NC	-	-	-	-	+	-	-	-
g.70250_74168del											
Años	Ampollas	Atrofia	Fotosensibilidad	Afectación dedos	Oral	Esófago	Intestino	Anal	Urogenita l	Ocular	Cáncer
16	+	++	+	-	+	-	-	-	-	-	-
25	+	++	-	-	+	++	-	-	-	+	-
41	+	++	+	+	++	-	-	-	-	+	-
52	+	+++	+	++	++	++	-	+	+	+	+

En el momento de su descripción estos pacientes tenían ente 16 y 52 años, todos habían tenido ampollas en la infancia, presentaban atrofia y poiquilodermia y afectación oral. El sujeto de mayor edad fue tratado de un carcinoma de células escamosas en el labio inferior. Nuestra paciente, de 7 años de edad, muestra un fenotipo limitado a las ampollas, atrofia y fragilidad cutánea.

Por lo tanto la paciente presenta una variante de FERMT1 que no ha sido descrita en otros pacientes y de su comparación con mutaciones que producen deleciones similares, con expresión muy baja de kindlina-1 o sin expresión de proteína funcional, no se obtiene una correlación genotipo-fenotipo, al incluir estas variantes fenotipos leves pero también dos casos de carcinoma de células escamosas, uno de ellos en un paciente anormalmente joven para presentar esta complicación.

Es muy importante que se pueda realizar el seguimiento de la paciente, para prevenir la aparición de complicaciones y para poder describir la evolución del SK en su variante mutacional.

6.3.5. Pacientes 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15

En los 8 individuos panameños de nuestro estudio, encontramos la mutación nonsense FERMT1: [c.811C>T (ex6)];[c.811C>T (ex6)]. Esta variante produce el cambio de una Arginina por un codon stop (R271X), produciendo el fin prematuro de la síntesis de la proteína y la pérdida completa de su función.

Los 8 sujetos panameños incluidos en este trabajo, pertenecientes a la tribu Ngöbe-Buglé, muestran ampollas, erosiones y costras, atrofia cutánea, poiquilodermia generalizada con marcada hiperpigmentación y frecuentes alteraciones bucodentales. El material documental del que disponemos no permite valorar la presencia de fotosensibilidad y no recoge ningún caso de fimosis ni de cáncer.

La mutación c.811C>T fue descrita por el Dr. Siegel y colaboradores en el año 2003, en 26 pacientes panameños de la misma procedencia que nuestros sujetos de estudio, en 2 familias caucásicas de Estados Unidos y en 1 familia de Omán (Siegel et al, 2003). De estas últimas no consta ninguna referencia sobre su fenotipo ni en este ni en otros artículos.

En el año 2004 el Dr. Penagos publicó una exhaustiva relación de las características clínicas de los 26 pacientes estudiados por Siegel, mostrando estos un fenotipo similar al de los pacientes panameños de este trabajo además de fimosis severa en el 80% de varones de su estudio. Esta cohorte es el grupo de pacientes más numeroso afectado por el SK, lo que es debido al alto grado de consanguineidad existente en la tribu Ngöbe-Buglé, condicionado por el aislamiento geográfico de la región en la que viven.

Entre los artículos revisados sólo se encuentran dos pacientes adicionales no pertenecientes a la cohorte panameña, con la variante c.811C>T. Uno de los casos, descrito por el Dr. Kantheti y colaboradores en el año 2017, corresponde a un paciente indio de 9 años de edad, nacido de padres consanguíneos, con el fenotipo habitual de SK.

El segundo caso, descrito por el Dr. Burch y colaboradores en el año 2006, es un varón de 7 años, que porta en heterocigosis la variante nonsense c.811C>T en el exón 6 de un alelo y la mutación frameshift 1755delT en el exón 14. La historia clínica del paciente revela la presencia de las características clínicas habituales de SK y fimosis.

El fenotipo de ambos casos concuerda con lo descrito tanto en los pacientes informados por el Dr. Siegel y por el Dr. Penagos como en nuestra cohorte. Por lo tanto, en conjunto, la mutación c.811C>T del exón 6, muestra un fenotipo similar al de otras mutaciones nonsense, con el añadido de una mayor frecuencia de casos de fimosis.

6.4. Modelo humanizado de SK

Aunque algunos aspectos relevantes de las genodermatosis como SK pueden ser estudiados en biopsias de piel, para mejorar el conocimiento de la patogénesis y para el desarrollo de nuevas terapias, es necesario el desarrollo de modelos preclínicos que recopilen las características in vivo de la enfermedad.

Hasta el momento, en SK se han desarrollado modelos de ratón con déficit de FERMT1 y un modelo knockout (Ussar et al, 2008; Rognoni et al, 2014), idóneos para estudios funcionales y patogénicos, pero inadecuados para el ensayo de tratamientos por las diferencias estructurales entre la piel humana y de ratón.

Los modelos de piel humanizada obtenidos a través del injerto de células humanas en ratones inmunodeficientes, ofrecen una solución práctica para el desarrollo de un modelo preclínico real (Garcia et al, 2010), con el que se pueden producir grandes cantidades de piel que mantienen las características de la enfermedad.

El equipo de Medicina Regenerativa del CIEMAT ha desarrollado piel humana bioingenierizada, que ha sido empleada con éxito en terapias regenerativas (Llanes et al, 2006) y que ha servido para el estudio tanto de genodermatosis como Paquioniquia congénita (García et al, 2010), Epidermolisis bullosa distrófica y Epidermolisis bullosa juncional (Gache et al, 2004, García et al, 2007), como de enfermedades genéticas que afectan a la piel del tipo Xeroderma Pigmentoso y otros trastornos cutáneos como la Psoriasis (Guerreo-Aspizua et al, 2010),

Siguiendo el mismo procedimiento, en el presente trabajo, se ha desarrollado un modelo de ratón humanizado de SK. Como ya hemos visto el objetivo del modelo es que la piel humana pase a formar parte de la piel del ratón manteniendo las características fisiológicas y patológicas de origen. En nuestros ratones la piel mostró el característico aspecto fino y arrugado “en papel de fumar” de los pacientes de SK. A nivel inmunohistoquímico el modelo recapituló las características de los respectivos pacientes (figuras 66 a 71, páginas 101 a 104). Así en el modelo obtenido a partir de los sujetos 4 y 13 se demostró la reduplicación de la lámina basal presente en los pacientes (figuras 68 y 69, páginas 102 y 103, respectivamente). Sin embargo el paciente 6 y el modelo obtenido a partir de sus células no muestran dicha reduplicación, lo que se confirma su validez (figura 70, página 103).

El modelo desarrollado presenta varias ventajas, como la disponibilidad de queratinocitos y fibroblastos interactuando en una matriz dérmica viva, con las influencias de un microambiente que juega un papel determinante en el mantenimiento de la estructura fisiológica y en el desarrollo de la patología. El modelo nos ofrece nuevas oportunidades de estudio de una enfermedad de muy baja prevalencia en condiciones similares a las del paciente, evitando por un lado los inconvenientes éticos y las molestias para los pacientes y proporcionándonos una cantidad de material para su estudio. Por último permitirá el ensayo de tratamientos como la terapia génica, pudiendo comprobar su eficacia y riesgos en un medio “real”, sin que represente un riesgo para la salud del paciente.

7. CONCLUSIONES

Las conclusiones de este trabajo son:

1. En este estudio se ha ampliado el número de pacientes descritos de SK, informándose además una nueva mutación.
2. Las características fenotípicas de nuestros pacientes son similares a las descritas en la literatura científica, sin que se alcance una correlación genotipo-fenotipo al comparar nuestra cohorte con los pacientes ya descritos.
3. Se ha desarrollado un modelo de ratón humanizado de SK que recapitula las características de los pacientes a partir de los cuales se ha generado. Este modelo podría convertirse en una herramienta importante para el ensayo de futuras terapias.

- **Almaani N, Liu L, Dopping-Hepenstal PJ, Lovell PA, Lai-Cheong JE, Graham RM, Mellerio JE, McGrath JA.** Autosomal dominant junctional epidermolysis bullosa. *BR J Dermatol* 2009;160:1094-7.
- **Arita K, Wessagowit V, Inamadar AC, Palit A, Fassihi H, Lai-Cheong JE, Pourreyron C, South AP, McGrath JA.** Unusual molecular findings in Kindler syndrome. *Br J Dermatol*. Dec 157:1252–6, 2007.
- **Ashton GH, McLean WH, South AP, Oyama N, Smith FJ, Al-Suwaid R, Al-Ismaily A, Atherton DJ, Harwood CA, Leigh IM, Moss C, Didona B, Zambruno G, Patrizi A, Eady RA, McGrath JA.** Recurrent mutations in kindlin-1, a novel keratinocyte focal contact protein, in the autosomal recessive skin fragility and photosensitivity disorder, Kindler syndrome. *J Invest Dermatol*. Jan;122(1):78-83, 2004.
- **Ashton GH.** Kindler syndrome. *Clin Exp Dermatol*. Mar;29(2):116-21, 2004.
- **Bialkowska K, Ma YQ, Bledzka K, Sossey-Alaoui K, Izem L, Zhang X, Malinin N, Qin J, Byzova T, Plow EF.** The integrin co-activator Kindlin-3 is expressed and functional in a non-hematopoietic cell, the endothelial cell. *J. Biol. Chem*. 285, 18640–18649, 2010.
- **Bouaouina M, Gault BT, Huet-Calderwood C, Bate N, Brahme NN, Barsukov IL, Critchley DR, Calderwood DA.** A conserved lipid-binding loop in the kindlin FERM F1 domain is required for kindlin-mediated $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ integrin coactivation. *J Biol Chem*. Mar 2;287(10):6979-90, 2012.
- **Boyd RS, Adam PJ, Patel S, Loader JA, Berry J, Redpath NT, Poyser HR, Fletcher GC, Burgess NA, Stamps AC, Hudson L, Smith P, Griffiths M, Willis TG, Karran EL, Oscier DG, Catovsky D, Terrett JA, Dyer MJ.** Proteomic analysis of the cell-surface membrane in chronic lymphocytic leukemia: identification of two novel proteins, BCNP1 and MIG2B. *Leukemia* 17, 1605–1612, 2003.
- **Burch JM, Fassihi H, Jones CA, Mengshol SC, Fitzpatrick JE, McGrath JA.** Kindler syndrome: a new mutation and new diagnostic possibilities. *Arch Dermatol*. May;142(5):620-4, 2006.
- **Caldeira A, Trinca WC, Flores TP, Costa AB, Brito Cde S, Weigert KL, Matos MS, Nicolini C, Obst FM.** A Kindler syndrome-associated squamous cell carcinoma treated with radiotherapy. *Rep Pract Oncol Radiother*. Nov-Dec;21(6):532-6, 2016.
- **Cardin-Langlois E, Hanna D, St-Amant M, Croteau F.** Invasive squamous cell carcinoma of the hand in a patient with Kindler syndrome: Case report and literature review. *Can J Plast Surg*. Fall;18(3):e41-3, 2010.

- **Carretero M, Guerrero-Aspizua S, Del Río M.** Applicability of bioengineered human skin: from preclinical skin humanized mouse models to clinical regenerative therapies. *Bioeng Bugs*. Jul-Aug;2(4):203-7, 2011.
- **Chacón-Solano E, León C, Díaz F, García-García F, García M, Escámez MJ, Guerrero-Aspizua S, Conti CJ, Mencía Á, Martínez-Santamaría L, Llames S, Pévida M, Carbonell-Caballero J, Puig-Butillé JA, Maseda R, Puig S, de Lucas R, Baselga E, Larcher F, Dopazo J, Del Río M.** Fibroblast activation and abnormal extracellular matrix remodelling as common hallmarks in three cancer-prone genodermatoses. *Br J Dermatol*. Sep;181(3):512-522, 2019.
- **Chishti AH, Kim AC, Marfatia SM, Lutchman M, Hanspal M, Jindal H, Liu SC, Low PS, Rouleau GA, Mohandas N, Chasis JA, Conboy JG, Gascard P, Takakuwa Y, Huang SC, Benz EJ Jr, Bretscher A, Fehon RG, Gusella JF, Ramesh V, Solomon F, Marchesi VT, Tsukita S, Tsukita S, Hoover KB, et al.** The FERM domain: a unique module involved in the linkage of cytoplasmic proteins to the membrane. *Trends Biochem Sci*. Aug;23(8):281-2, 1998.
- **Cserhalmi-Friedman PB, Tang Y, Adler A, Krey L, Grifo JA, Christiano AM.** Preimplantation genetic diagnosis in two families at risk for recurrence of Herlitz junctional epidermolysis bullosa. *Exp Dermatol*. 2000 Aug;9(4):290-7, 2000.
- **Del Río M, Larcher F, Serrano F, Meana A, Muñoz M, Garcia M, Muñoz E, Martin C, Bernad A, Jorcano JL.** A preclinical model for the analysis of genetically modified human skin in vivo. *Hum Gene Ther*. May 20;13(8):959-68, 2002.
- **DiPersio CM, Shah S, Hynes RO.** Alpha 3A beta 1 integrin localizes to focal contacts in response to diverse extracellular matrix proteins. *J Cell Sci*; 108(Pt 6):2321–36, 1995
- **Emanuel PO, Rudikoff D, Phelps RG.** Aggressive squamous cell carcinoma in Kindler syndrome. *Skinmed*. Nov-Dec;5(6):305-7, 2006.
- **Escámez MJ, García M, Larcher F, Meana A, Muñoz E, Jorcano JL, Del Río M.** An in vivo model of wound healing in genetically modified skin-humanized mice. *J Invest Dermatol*. Dec;123(6):1182-91, 2004.
- **Even-Ram S, Doyle AD, Conti MA, Matsumoto K, Adelstein RS, Yamada KM.** Myosin IIA regulates cell motility and actomyosin-microtubule crosstalk. *Nat Cell Biol* 9:299–309, 2007.
- **Fassihi H, Wessagowit V, Jones C, Dopping-Hepenstal P, Denyer J, Mellerio JE, Clark S, McGrath JA.** Neonatal diagnosis of Kindler syndrome. *J Dermatol Sci*. Sep;39(3):183-5, 2005.

- Fine JD, Eady RA, Bauer EA, Briggaman RA, Bruckner-Tuderman L, Christiano A, Heagerty A, Hintner H, Jonkman MF, McGrath J, McGuire J, Moshell A, Shimizu H, Tadini G, Uitto J.** Revised classification system for inherited epidermolysis bullosa: report of the Second International Consensus Meeting on diagnosis and classification of epidermolysis bullosa. *J Am Acad Dermatol*;42:1051-66, 2000.
- Fine JD, Eady RA, Bauer EA, Bauer JW, Bruckner-Tuderman L, Heagerty A, Hintner H, Hovnanian A, Jonkman MF, Leigh I, McGrath JA, Mellerio JE, Murrell DF, Shimizu H, Uitto J, Vahlquist A, Woodley D, Zambruno G.** The classification of inherited epidermolysis bullosa (EB): report of the Third International Consensus Meeting on Diagnosis and Clasification of EB. *J Am Acad Dermatol* ;58:931-50, 2008.
- Fine JD, Mellerio. JE.** Extracutaneous manifestations and complications of inherited epidermolysis bullosa. Part II. Other organs. *J Am Acad Dermatol* 61:387-402, 2009.
- Fischer IA, Kazandjieva J, Vassileva S, Dourmishev A.** Kindler syndrome: a case report and proposal for clinical diagnostic criteria. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat. Jun*;14(2):61-7, 2005.
- Freeman EB, Köglmeier J, Martinez AE, Mellerio JE, Haynes L, Sebire NJ, Lindley KJ, Shah N.**Gastrointestinal complications of epidermolysis bullosa in children. *Br J Dermatol. Jun*;158(6):1308-14, 2008.
- Frew JW, Martin LK, Nijsten T, Murrell DF.** Quality of live evaluation in epidermolisys bullosa (EB) through the development of the QOLEB questionnaire: an EB-specific quality of live instrument. *Br J Dermatol* ;61:387-402, 2009.
- Gache Y, Baldeschi C, Del Rio M, Gagnoux-Palacios L, Larcher F, Lacour JP, Meneguzzi G.** Construction of skin equivalents for gene therapy of recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Hum Gene Ther. Oct*;15(10):921-33, 2004.
- Garcia M, Escamez MJ, Carretero M, Mirones I, Martinez-Santamaria L, Navarro M, Jorcano JL, Meana A, Del Rio M, Larcher F.** Modeling normal and pathological processes through skin tissue engineering. *Mol Carcinog. Aug*;46(8):741-5, 2007.
- García M, Llames S, García E, Meana A, Cuadrado N, Recasens M, Puig S, Nagore E, Illera N, Jorcano JL, Del Rio M, Larcher F.** In vivo assessment of acute UVB responses in normal and Xeroderma Pigmentosum (XP-C) skin-humanized mouse models. *Am J Pathol. Aug*;177(2):865-72, 2010.
- Goult BT, Bouaouina M, Harburger DS, Bate N, Patel B, Anthis NJ, Campbell ID, Calderwood DA, Barsukov IL, Roberts GC, Critchley DR.** The structure of the N-terminus of kindlin-1: a domain important for alpha*i*beta3 integrin activation. *J Mol Biol. Dec* 18;394(5):944-56, 2009.

- **Gozgit JM, Pentecost BT, Marconi SA, Otis CN, Wu C, Arcaro KF.** Use of an aggressive MCF-7 cell line variant, TMX2-28, to study cell invasion in breast cancer. *Mol Cancer Res.* Dec;4(12):905-13, 2006.
- **Guerrero-Aspizua S, García M, Murillas R, Retamosa L, Illera N, Duarte B, Holguín A, Puig S, Hernández MI, Meana A, Jorcano JL, Larcher F, Carretero M, Del Río M.** Development of a bioengineered skin-humanized mouse model for psoriasis: dissecting epidermal-lymphocyte interacting pathways. *Am J Pathol.* Dec;177(6):3112-24, 2010.
- **Haber, R.M. and Hanna, W.M.** Kindler syndrome. Clinical and ultrastructural findings. *Arch. Dermatol.*, 132, 1487–1490, 1996.
- **Harburger DS, Bouaouina M, Calderwood DA.** Kindlin-1 and -2 directly bind the C-terminal region of beta integrin cytoplasmic tails and exert integrin-specific activation effects. *J Biol Chem* 284:11485-114897, 2009.
- **Has C, Wessagowit V, Pascucci M, Baer C, Didona B, Wilhelm C, Pedicelli C, Locatelli A, Kohlhase J, Ashton GH, Tadini G, Zambruno G, Bruckner-Tuderman L, McGrath JA, Castiglia D.** Molecular basis of Kindler syndrome in Italy: novel and recurrent Alu/Alu recombination, splice site, nonsense, and frameshift mutations in the KIND1 gene. *J Invest Dermatol.* Aug;126(8):1776-83, 2006.
- **Has C, Yordanova I, Balabanova M, Kazandjieva J, Herz C, Kohlhase J, Bruckner-Tuderman L.** A novel large FERMT1 (KIND1) gene deletion in Kindler syndrome. *J Dermatol Sci.* Dec;52(3):209-12, 2008.
- **Has C, Ludwig RJ, Herz C, Kern JS, Ussar S, Ochsendorf FR, Kaufmann R, Schumann H, Kohlhase J, Bruckner-Tuderman L.** C-terminally truncated kindlin-1 leads to abnormal adhesion and migration of keratinocytes. *Br J Dermatol.* Nov;159(5):1192-6, 2008.
- **Has C, Herz C, Zimina E, Qu HY, He Y, Zhang ZG, Wen TT, Gache Y, Aumailley M, Bruckner-Tuderman L.** Kindlin-1 Is required for RhoGTPase-mediated lamellipodia formation in keratinocytes. *Am J Pathol* Oct;175(4):1442-52, 2009.
- **Has C, Burger B, Volz A, Kohlhase J, Bruckner-Tuderman L, Itin P.** Dermatology. Mild clinical phenotype of Kindler syndrome associated with late diagnosis and skin cancer. *J Invest Dermatol.* Dec;121(4):309-12, 2010.
- **Has C, Castiglia D, del Río M, Diez MG, Piccinni E, Kiritsi D, Kohlhase J, Itin P, Martin L, Fischer J, Zambruno G, Bruckner-Tuderman L.** Hum Mutat. Kindler syndrome: extension of FERMT1 mutational spectrum and natural history. *Hum Mutat.* Nov;32(11):1204-12, 2011.

- **Hauck AL, Swanson KS, Kenis PJ, Leckband DE, Gaskins HR, Schook LB.** Twists and turns in the development and maintenance of the mammalian small intestine epithelium. *Birth Defects Res C Embryo Today* 75: 58–71, 2005.
- **Hayashi S, Shimoya K, Itami S, Murata Y.** Pregnancy and delivery with Kindler syndrome. *Gynecol Obstet Invest.* 64(2):72-4, 2007.
- **He Y, Esser P, Heinemann A, Bruckner-Tuderman L, Has C.** Kindlin-1 and -2 have overlapping functions in epithelial cells implications for phenotype modification. *Am J Pathol.* Mar;178(3):975-82, 2011.
- **Heinemann A, He Y, Zimina E, Boerries M, Busch H, Chmel N, Kurz T, Bruckner-Tuderman L, Has C.** Induction of phenotype modifying cytokines by FERMT1 mutations. *Hum Mutat.* Apr;32(4):397-406, 2011.
- **Herz C, Aumailley M, Schulte C, Schlötzer-Schrehardt U, Bruckner-Tuderman L, Has C.** Kindlin-1 is a phosphoprotein involved in regulation of polarity, proliferation, and motility of epidermal keratinocytes. *J Biol Chem.* Nov 24;281(47):36082-90, 2006.
- **Hirsch T, Rothoef T, Teig N, Bauer JW, Pellegrini G, De Rosa L, Scaglione D, Reichelt J, Klausegger A, Kneisz D, Romano O, Secone Seconetti A, Contin R, Enzo E, Jurman I, Carulli S, Jacobsen F, Luecke T, Lehnhardt M, Fischer M, Kueckelhaus M, Quaglino D, Morgante M, Biciato S, Bondanza S, De Luca M.** Regeneration of the entire human epidermis using transgenic stem cells. *Nature.* Nov 16;551(7680):327-332, 2017.
- **Hovnanian A, Blanchet-Bardon C, de Prost Y.** Poikiloderma of Theresa Kindler: report of a case with ultrastructural study, and review of the literature. *Pediatr Dermatol.* Jun;6(2):82-90, 1989.
- **Hynes, R.O.** Integrins. Bidirectional allosteric signaling machines. *Cell* 110, 673-687, 2002.
- **Intong LR, Murrell DF.** How to take skin biopsies for epidermolysis bullosa. *Dermatol Clin* 2010;28:197-200), 2010.
- **Intong LR, Murrell DF.** Inherited epidermolysis bullosa: new diagnostic criteria and classification. *Clin Dermatol.* 2012 Jan-Feb;30(1):70-7, 2012.
- **Itoh T, Takenawa T.** Phosphoinositide-binding domains: Functional units for temporal and spatial regulation of intracellular signalling. *Cell Signal.* Sep;14(9):733-43, 2002.
- **Jen M, Nallasamy S.** Ocular manifestations of genetic skin disorders. *Clin Dermatol.* Mar-Apr;34(2):242-75, 2016.

- **Jobard F, Bouadjar B, Caux F, Hadj-Rabia S, Has C, Matsuda F, Weissenbach J, Lathrop M, Prud'homme JF, Fischer J.** Identification of mutations in a new gene encoding a FERM family protein with a pleckstrin homology domain in Kindler syndrome. *Hum Mol Genet.* Apr 15;12(8):925-35, 2003.
- **Jones JC, Hopkinson SB, Goldfinger LE.** Structure and assembly of hemidesmosomes. *Bioessays* ;20:488–94, 1998.
- **Kantheti P, Kubba A, Prabhu A, Batrani M, Hiremagalore R.** Two novel mutations in KIND1 in Indian patients with Kindler syndrome. *Clin Exp Dermatol.* Jan;42(1):95-97, 2017.
- **Kato K, Shiozawa T, Mitsushita J, Toda A, Horiuchi A, Nikaido T, Fujii S, Konishi I.** Expression of the mitogen-inducible gene-2 (mig-2) is elevated in human uterine leiomyomas but not in leiomyosarcomas. *Hum Pathol* 35, 55–60, 2004.
- **Kern JS, Herz C, Haan E, Moore D, Nottelmann S, von Lilien T, Greiner P, Schmitt-Graeff A, Opitz OG, Bruckner-Tuderman L, Has C.** Chronic colitis due to an epithelial barrier defect: the role of kindlin-1 isoforms. *J Pathol* 213:462-470, 2007.
- **Kindler T.** Congenital poikiloderma with traumatic bulla formation and progressive cutaneous atrophy.. *Br J Dermatol.* Mar;66(3):104-11, 1954.
- **Kloeker S, Major MB, Calderwood DA, Ginsberg MH, Jones DA, Beckerle MC.** The Kindler syndrome protein is regulated by transforming growth factor-beta and involved in integrin-mediated adhesion. *J Biol Chem.* Feb 20;279(8):6824-33, 2004.
- **Kuijpers TW, van de Vijver E, Weterman MA, de Boer M, Tool AT, van den Berg TK, Moser M, Jakobs ME, Seeger K, Sanal O, Unal S, Cetin M, Roos D, Verhoeven AJ, Baas F.** LAD-1/variant syndrome is caused by mutations in FERMT3. *Blood* 113, 4740–4746, 2008.
- **Lai-Cheong JE, Liu L, Sethuraman G, Kumar R, Sharma VK, Reddy SR, Vahlquist A, Pather S, Arita K, Wessagowit V, McGrath JA.** Five new homozygous mutations in the KIND1 gene in Kindler syndrome. *J Invest Dermatol.* Sep;127(9):2268-70, 2007.
- **Lai-Cheong JE, Ussar S, Arita K, Hart IR, McGrath JA.** Colocalization of kindlin-1, kindlin-2, and migfilin at keratinocyte focal adhesion and relevance to the pathophysiology of Kindler syndrome. *J Invest Dermatol.* Sep;128(9):2156-65, 2008.
- **Lai-Cheong JE, Parsons M, Tanaka A, Ussar S, South AP, Gomathy S, Mee JB, Barbaroux JB, Techanukul T, Almaani N, Clements SE, Hart IR, McGrath JA.** Loss-of-function FERMT1 mutations in kindler syndrome implicate a role for fermitin family homolog-1 in integrin activation. *Am J Pathol.* Oct;175(4):1431-41, 2009.

- **Lai-Cheong JE, Tanaka A, Hawche G, Emanuel P, Maari C, Taskesen M, Akdeniz S, Liu L, McGrath JA.** Kindler syndrome: a focal adhesion genodermatosis. *Br J Dermatol.* 2009 Feb;160(2):233-42, 2009.
- **Lai-Cheong JE, McGrath JA.** Kindler syndrome. *Dermatol Clin* 28 :119-124.2010
- **Lanschuetzer CM, Muss WH, Emberger M, Pohla-Gubo G, Klaussegger A, Bauer JW, Hintner H.** Characteristic immunohistochemical and ultrastructural findings indicate that Kindler's syndrome is an apoptotic skin disorder. *J Cutan Pathol* 30, 553–560, 2003.
- **Larjava H, Plow EF, Wu C.** Kindlins: essential regulators of integrin signalling and cell-matrix adhesion. *EMBO Rep.* Dec;9(12):1203-8, 2008
- **Llames SG, Del Rio M, Larcher F, García E, García M, Escamez MJ, Jorcano JL, Holguín P, Meana A.** Human plasma as a dermal scaffold for the generation of a completely autologous bioengineered skin. *Transplantation.* Feb 15;77(3):350-5, 2004
- **Lo SH.** Focal adhesions: what's new inside. *Dev Biol* , 294:280–29, 2006.
- **Lotem M, Raben M, Zeltser R, Landau M, Sela M, Wygoda M, Tochner ZA.** Kindler syndrome complicated by squamous cell carcinoma of the hard palate: successful treatment with high-dose radiation therapy and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Br J Dermatol.* Jun;144(6):1284-6, 2001.
- **Mackinnon AC, Qadota H, Norman KR, Moerman DG, Williams BD.** C. elegans PAT-4/ILK functions as an adaptor protein within integrin adhesion complexes. *Curr Biol* May 14;12(10):787-97,2002.
- **Malinin NL, Zhang L, Choi J, Ciocea A, Razorenova O, Ma YQ, Podrez EA, Tosi M, Lennon DP, Caplan AI, Shurin SB, Plow EF, Byzova TV.** A point mutation in KINDLIN3 ablates activation of three integrin subfamilies in humans. *NatMed* 15, 313–318, 2009.
- **Mallo S, Rodríguez-Díaz E, Blanco S, Alvarez-Cuesta C, Galache C, Nosti D.** Kindler syndrome: presentation of a case. *Actas Dermosifiliogr.* Dec;96(10):677-80, 2005.
- **Mansur AT, Elcioglu NH, Aydingöz IE, Akkaya AD, Serdar ZA, Herz C, Bruckner-Tuderman L, Has C.** Novel and recurrent KIND1 mutations in two patients with Kindler syndrome and severe mucosal involvement. *Acta Derm Venereol* ;87:563–5, 2007.
- **Margadant C, Charafeddine RA, Sonnenberg A.** Unique and redundant functions of integrins in the epidermis. *FASEB J.* Nov;24(11):4133-52, 2010
- **Martignago BC, Lai-Cheong JE, Liu L, McGrath JA, Cestari TF.** Recurrent KIND1 (C20orf42) gene mutation, c.676insC, in a Brazilian pedigree with Kindler syndrome. *Br J Dermatol* 2007;157:1281–4, 2007.

- **McMillan JR, Akiyama M, Shimizu H.** Epidermal basement membrane zone components: ultrastructural distribution and molecular interactions. *J Dermatol Sci.* May;31(3):169-77, 2003.
- **Meana A, Iglesias J, Del Rio M, Larcher F, Madrigal B, Fresno MF, Martin C, San Roman F, Tevar F.** Large surface of cultured human epithelium obtained on a dermal matrix based on live fibroblast-containing fibrin gels. *Burns.* Nov;24(7):621-30, 1998.
- **Mendes L, Nogueira L, Vilasboas V, Talhari C, Talhari S, Santos M.** Kindler syndrome: report of two cases. *An Bras Dermatol.* Sep-Oct;87(5):779-81, 2012.
- **Meves A, Stremmel C, Gottschalk K, Fassler R.** The Kindlin protein family: new members to the club of focal adhesion proteins. *Trends Cell Biol* ;19:504–13, 2009.
- **Mizutani H, Masuda K, Nakamura N, Takenaka H, Tsuruta D, Katoh N.** Cutaneous and laryngeal squamous cell carcinoma in mixed epidermolysis bullosa, kindler syndrome. *Case Rep Dermatol.* May;4(2):133-8, 2012.
- **Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R.** The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell.* Nov;31(1):11-24, 1982.
- **Montanez E, Ussar S, Schifferer M, Bösl M, Zent R, Moser M, Fässler R.** Kindlin-2 controls bidirectional signaling of integrins. *Genes Dev.* May 15;22(10):1325-30,2008.
- **Mory A, Feigelson SW, Yarali N, Kilic SS, Bayhan GI, Gershoni-Baruch R, Etzioni A, Alon R.** Kindlin-3: a new gene involved in the pathogenesis of LAD-III. *Blood.* Sep 15;112(6):2591, 2008.
- **Moser M, Nieswandt B, Ussar S, Pozgajova M, Fässler R.** Kindlin-3 is essential for integrin activation and platelet aggregation. *Nat Med.* Mar;14(3):325-30, 2008.
- **Moser M, Bauer M, Schmid S, Ruppert R, Schmidt S, Sixt M, Wang HV, Sperandio M, Fässler R.** Kindlin-3 is required for beta2 integrin-mediated leukocyte adhesion to endothelial cells. *Nat Med.* Mar;15(3):300-5, 2009.
- **Natsuga K, Nishie W, Shinkuma S, Nakamura H, Matsushima Y, Tatsuta A, Komine M, Shimizu H.** Expression of exon-8-skipped kindlin-1 does not compensate for defects of Kindler syndrome. *J Dermatol Sci.* Jan;61(1):38-44, 2011.
- **Nofal E, Assaj M, Elmosalany K.** Kindler Syndrome: a study of Egyptian cases with evaluation of severity. *Int J Dermatol.*;47:658-62, 2008.
- **Pantelouris EM.** Absence of thymus in a mouse mutant. *Nature.* Jan 27;217(5126):370-1, 1968.

- Pasini EM, Kirkegaard M, Mortensen P, Lutz HU, Thomas AW, Mann M.** In-depth analysis of the membrane and cytosolic proteome of red blood cells. *Blood*. Aug 1;108(3):791-801, 2006.
- Penagos H, Jaen M, Sancho MT, Saborio MR, Fallas VG, Siegel DH, Frieden IJ.** Kindler syndrome in native Americans from Panama: report of 26 cases. *Arch Dermatol*, Aug;140(8):939-44, 2004.
- Petricca G, Leppilampi M, Jiang G, Owen GR, Wiebe C, Tu Y et al.** Localization and potential function of kindlin-1 in periodontal tissues. *Eur J Oral Sci* 117:518-527, 2009.
- Pohla-Gubo G, Cepeda-Valdés R, Hinter H.** Immunofluorescence mapping for the diagnosis of epidermolysis bullosa. *Dermatol Clin* 28:201-10, 2010.
- Rheinwald JG, Green H.** Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: The formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 6,331-43, 1975.
- Rogalski TM, Mullen GP, Gilbert MM, Williams BD, Moerman DG.** The UNC-112 gene in *Caenorhabditis elegans* encodes a novel component of cell-matrix adhesion structures required for integrin localization in the muscle cell membrane. *J Cell Biol*. Jul 10;150(1):253-64, 2000.
- Rognoni E, Widmaier M, Jakobson M, Ruppert R, Ussar S, Katsougkri D, Böttcher RT, Lai-Cheong JE, Rifkin DB, McGrath JA, Fässler R.** Kindlin-1 controls Wnt and TGF- β availability to regulate cutaneous stem cell proliferation. *Nat Med*. Apr;20(4):350-9, 2014.
- Sadler E, Klaussegger A, Muss W, Deinsberger U, Pohla-Gubo G, Laimer M, Lanschuetzer C, Bauer JW, Hintner H.** Novel KIND1 gene mutation in Kindler syndrome with severe gastrointestinal tract involvement. *Arch Dermatol* 142, 1619–1624, 2006
- Sánchez-Jimeno C, Escámez MJ, Ayuso C, Trujillo-Tiebas MJ, Del Río M.** Genetic diagnosis of epidermolysis bullosa: recommendations from an expert Spanish research group. *Actas Dermosifiliogr*. Mar;109(2):104-12, 2018.
- Sethuraman G, Fassihi H, Ashton GH, Bansal A, Kabra M, Sharma VK, McGrath JA.** An Indian child with Kindler syndrome resulting from a new homozygous nonsense mutation (C468X) in the KIND1 gene. *Clin Exp Dermatol* ;30:286–8, 2005.
- Shi, X. and Wu, C.** A suppressive role of mitogen inducible gene-2 in mesenchymal cancer cell invasion. *Mol Cancer Res* 6, 715–724, 2008.

- Shimizu H, Sato M, Ban M, Kitajima Y, Ishizaki S, Harada T, Bruckner-Tuderman L, Fine JD, Burgeson R, Kon A, McGrath JA, Christiano AM, Uitto J, Nishikawa T. Immunohistochemical, ultrastructural, and molecular features of Kindler syndrome distinguish it from dystrophic epidermolysis bullosa. *Arch Dermatol.* Sep;133(9):1111-7, 1997.
- Siegel DH, Ashton GH, Penagos HG, Lee JV, Feiler HS, Wilhelmsen KC, South AP, Smith FJ, Prescott AR, Wessagowit V, Oyama N, Akiyama M, Al Aboud D, Al Aboud K, Al Githami A, Al Hawsawi K, Al Ismaily A, Al-Suwaid R, Atherton DJ, Caputo R, Fine JD, Frieden IJ, Fuchs E, Haber RM, Harada T, Kitajima Y, Mallory SB, Ogawa H, Sahin S, Shimizu H, Suga Y, Tadini G, Tsuchiya K, Wiebe CB, Wojnarowska F, Zaghloul AB, Hamada T, Mallipeddi R, Eady RA, McLean WH, McGrath JA, Epstein EH. Loss of kindlin-1, a human homolog of the *Caenorhabditis elegans* actin-extracellular-matrix linker protein UNC-112, causes Kindler syndrome. *Am J Hum Genet.* Jul;73(1):174-87, 2003
- Techanukul T, Sethuraman G, Zlotogorski A, Horev L, Macarov M, Trainer A, Fong K, Lens M, Medenica L, Ramesh V, McGrath JA, Lai-Cheong JE. Novel and recurrent FERMT1 gene mutations in Kindler Syndrome. *Acta Derm Venereol* 91:267-270, 2011.
- Thomson MA, Ashton GH, McGrath JA, Eady RA, Moss C. Retrospective diagnosis of Kindler syndrome in a 37-year-old man. *Clin Exp Dermatol.* Jan;31(1):45-7, 2006.
- Tu Y, Wu S, Shi X, Chen K, Wu C. Migfilin and Mig-2 link focal adhesions to filamin and the actin cytoskeleton and function in cell shape modulation. *Cell.* Apr 4;113(1):37-47, 2003.
- Tsuruta D, Hopkinson SB, Jones JC. Hemidesmosome protein dynamics in live epithelial cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 54:122–34, 2003.
- Tsuruta D, Hashimoto T, Hamill KJ, Jones JC. Hemidesmosomes and focal contact proteins: functions and cross-talk in keratinocytes, bullous diseases and wound healing. *J Dermatol Sci.* Apr;62(1):1-7, 2011.
- Ussar S, Wang HV, Linder S, Fässler R, Moser M. The Kindlins: subcellular localization and expression during murine development. *Exp Cell Res.* Oct 1;312(16):3142-51, 2006.
- Ussar S, Moser M, Widmaier M, Rognoni E, Harrer C, Genzel-Boroviczeny O, Fässler R. Loss of Kindlin-1 causes skin atrophy and lethal neonatal intestinal epithelial dysfunction. *PLoS Genet* Dec;4(12):e1000289. 2008.
- Uitto J, Pulkkinen L. The genodermatoses: candidate diseases for gene therapy. *Hum Gene Ther.* 11:2267-75, 2000.
- Vicente-Manzanares M, Webb DJ, Horwitz AR. Cell migration at a glance. *J Cell Sci* 118:4917–4919, 2005.

- **Weinstein EJ, Bournier M, Head R, Zakeri H, Bauer C, Mazzarella R.** URP1: a member of a novel family of PH and FERM domain-containing membrane-associated proteins is significantly over-expressed in lung and colon carcinomas. *Biochim Biophys Acta.* Apr 17;1637(3):207-16, 2003.
- **Wiebe, C.B. and Larjava, H.S.** Abnormal deposition of type VII collagen in Kindler syndrome. *Arch. Dermatol. Res.*, 291, 6–13, 1999.
- **Wiebe CB, Petricca G, Häkkinen L, Jiang G, Wu C, Larjava HS.** Kindler syndrome and periodontal disease: review of the literature and a 12-year follow-up case. *J Periodontol.* 2008 May;79(5):961-6, 2008.
- **Youssefian L, Vahidnezhad H, Barzegar M, Li Q, Sotoudeh S, Yazdanfar A, Ehsani AH, Kajbafzadeh AM, Mozafari N, Ebrahimi Daryani N, Agha-Hosseini F, Zeinali S, Uitto J.** The Kindler syndrome: a spectrum of FERMT1 mutations in Iranian families. *J Invest Dermatol.* May;135(5):1447-1450, 2015.
- **Zapatero-Solana E, García-Giménez JL, Guerrero-Aspizua S, García M, Toll A, Baselga E, Durán-Moreno M, Markovic J, García-Verdugo JM, Conti CJ, Has C, Larcher F, Pallardó FV, Del Rio M.** Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Kindler syndrome. *Orphanet J Rare Dis.* 2014 Dec 21;9:211, 2014.

